

ALLEGATO

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

1) Il capitolo B.42 è sostituito dal seguente:

«B.42. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY

INTRODUZIONE

1. Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (OCSE Guidelines for the Testing of Chemicals) e i metodi di prova dell'UE fondati su tali linee guida vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. Il metodo di prova (TM) originale per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, denominato Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429; capitolo B.42 del presente allegato) era stato precedentemente adottato (1) e sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla validazione dell'LLNA nonché una revisione delle attività a questa associate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L'LLNA aggiornato poggia sulla valutazione dell'esperienza acquisita e dei dati scientifici (12). Questo metodo di prova è il secondo metodo concepito per valutare il potenziale di irritazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. L'altro metodo di prova (OCSE Test Guideline 406; capitolo B.6 del presente allegato) fa ricorso a saggi con porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (13). L'LLNA offre vantaggi rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (13) dal punto di vista del benessere degli animali. Questo metodo di prova aggiornato sull'LLNA comprende un insieme di standard di prestazione (appendice 1) che può essere usato per valutare lo stato di convalida di metodi di prova nuovi e/o modificati che sono simili, da un punto di vista funzionale e meccanico, all'LLNA, conformemente ai principi del documento orientativo dell'OCSE "OECD Guidance Document n. 34" (14).
2. L'LLNA studia la fase di induzione dell'irritazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per la valutazione dose-risposta. Si deve osservare che i sensibilizzanti di tipo leggero/medio che sono raccomandati come sostanze di controllo positivo (PC) per i saggi sui porcellini d'India (ossia metodo B.6; OCSE Test Guideline 406) (13) sono adatti anche per l'LLNA (6) (8) (15). In questo metodo di prova è anche descritta l'opzione di un approccio ridotto all'LLNA (rLLNA), che potrebbe prevedere il ricorso fino al 40 % di animali in meno (16) (17) (18). L'rLLNA potrebbe essere impiegato quando vi sia l'esigenza regolamentare di confermare una previsione negativa di irritabilità cutanea potenziale, purché tutte le altre specifiche del protocollo LLNA siano rispettate, così come descritto nel presente metodo di prova. La previsione di un risultato negativo dovrebbe essere fatta sulla base di tutte le informazioni disponibili elencate al punto 4. Prima di applicare l'approccio rLLNA, devono essere fornite giustificazioni chiare e precise motivazioni scientifiche. Se con l'rLLNA si ottiene, contrariamente alle aspettative, un risultato positivo o equivoco, potrebbe essere necessario effettuare ulteriori saggi per interpretare o chiarire tale risultato. L'rLLNA non è adatto a essere impiegato per l'identificazione dei pericoli delle sostanze irritanti per la cute quando sono necessarie informazioni sulla dose-risposta come la classificazione in una sottocategoria per il regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele e per il Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) delle Nazioni Unite.

DEFINIZIONI

3. Le definizioni utilizzate sono fornite nell'appendice 2.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. L'LLNA costituisce un metodo alternativo da usarsi per identificare le sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA vada usato in sostituzione del test sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma. Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza dell'LLNA per la sostanza (data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche con l'LLNA — cfr. il punto 5) e servono a scegliere la dose iniziale.
5. L'LLNA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo. Inoltre, l'LLNA rappresenta un significativo miglioramento (minor sofferenza e dolore fisico) del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto. L'LLNA è basato sull'attenta valutazione delle manifestazioni immunologiche stimulate dalle sostanze chimiche durante la fase di induzione della sensibilizzazione. Diversamente dai saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), l'LLNA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India (13). Per questo motivo, l'LLNA riduce la sofferenza e il dolore fisico degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406, occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 (13) (ad esempio, risposte falsi negativi nell'LLNA con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei [tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi] (19) (20), o solubilità della sostanza usata per il saggio). Inoltre,

le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (21) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Infine, in considerazione della limitata banca dati di validazione, che consisteva prevalentemente in formulati pesticidi, l'LLNA ha maggiori possibilità del saggio sui porcellini d'India di fornire un risultato positivo per questi tipi di sostanze (22). Tuttavia, nel sottoporre a prova le formulazioni, si potrebbe valutare l'opportunità di inserire come sostanze di riferimento sostanze simili con risultati noti, per dimostrare che l'LLNA funziona correttamente (cfr. il punto 16). Fatte salve le restrizioni indicate, si dovrebbe ricorrere all'LLNA per testare qualsiasi sostanza, a meno che una sostanza non possieda proprietà che possono interferire con l'accuratezza dello stesso.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale alla base dell'LLNS è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione dei linfociti nei linfonodi responsabili del drenaggio della zona di applicazione della sostanza sperimentale. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa oggettiva della sensibilizzazione. La proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media osservata in ciascun gruppo sperimentale con quella del controllo trattato con il veicolo (gruppo VC). Occorre determinare il rapporto tra la proliferazione media in ciascun gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato con veicolo, definito "Indice di stimolazione" (SI), che deve essere ≥ 3 prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente classificata come potenziale. Le procedure qui descritte si basano sull'uso della marcatura radioattiva in vivo per misurare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio. È possibile però impiegare anche altri criteri per la valutazione del numero di cellule in fase di proliferazione, a condizione che lo standard di prestazione sia pienamente soddisfatto (appendice 1).

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, del ceppo CBA/Ca o CBA/J, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile utilizzare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta all'LLNA non esistono differenze significative specifiche per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (23), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. Idealmente il valore dovrebbe essere pari al 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertare che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a una procedura di estrazione forzata in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo quando siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile, come una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta sia ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la comparabilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr.

il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione > 3 rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile ma non eccessiva (ad esempio, un indice > 20 sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide [Chemical Abstracts Service (CAS) 101-86-0] in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v) e un 5 % di mercaptobenzotiazolo (CAS 149-30-4) in N,N-dimetilformammide (cfr. l'appendice 1, tabella 1). In determinate circostanze, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra.

12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli ≤ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).
13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche dovrebbero essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati storica pregressa.
14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, possono essere messi in dubbio i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico sul controllo positivo accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere i controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo dei controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (12).
15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (24). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.
16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze sperimentali. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:
 - somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame,
 - caratteristiche fisiche/chimiche note,
 - dati di supporto provenienti dall'LLNA,
 - dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-14). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche (3) e (5). Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea locale (3) (25). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).
19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone, olio di oliva (4:1, v/v), N,N-dimetilformammide, metiletilchetone, glicole propilenico e dimetilsolfossido (19), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.
20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 35). Inoltre, quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale è possibile valutare l'opportunità di ridurre il numero di topi nel gruppo del controllo positivo (12). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. Tuttavia, alcune autorità di regolamentazione potrebbero accettare dati aggregati; in questi casi gli utilizzatori possono scegliere se raccogliere dati individuali o aggregati.

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18), è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di dose appropriato per l'LLNA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nello studio LLNA principale, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24) e/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 0). La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o alla concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.
22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA principale, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppo di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazione per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 6). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (25). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione) e il giorno 6. Inoltre, il giorno 6, lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un giorno di misurazione qualsiasi (26) (27). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazione	Punteggio
Nessun segno di eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (26) (27), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (30) (31) (33) (34).
24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (35) (36) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamiento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 6, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (37).

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

- *Giorno 1*: Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi all'osservazione clinica. Applicare 25 µL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.
- *Giorni 2 e 3*: Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.
- *Giorni 4 e 5*: Nessun trattamento.
- *Giorno 6*: Registrare il peso di ciascun animale. Iniettare 250 µL di soluzione salina sterile tampone fosfato (PBS) contenente 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) di (^3H)-metil timidina triziata a tutti i topi trattati e di controllo, attraverso la vena caudale. In alternativa, iniettare 250 µL di PBS sterile contenente 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) di ^{125}I -iododeossiridina e 10^{-3}M fluorodeossiridina a tutti i topi, attraverso la vena caudale. Cinque ore (5 h) dopo, gli animali vanno sottoposti ad eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato per ciascun animale separatamente (sistema del singolo animale), oppure per gruppo sperimentale (sistema del gruppo di trattamento). I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano alla voce bibliografica (12). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante biopsie effettuate all'autopsia).

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Mediante attenta disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 µm o un'altra tecnica accettabile si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali asportate bilateralmente con il sistema del singolo animale o, in alternativa, con il sistema del gruppo di trattamento. Le cellule linfonodali vanno lavate due volte con abbondante PBS e il DNA è precipitato con acido tricloroacetico al 5 % (TCA) a 4 °C per 18 ore (3). I granuli vanno poi rimessi in sospensione in 1 mL di TCA e quindi trasferiti in fiale di scintillazione contenenti 10 mL di liquido di scintillazione per il conteggio del ^3H , oppure trasferiti direttamente in tubi per conteggio gamma per il conteggio dello ^{125}I .

Determinazione della proliferazione delle cellule (radioattività incorporata)

27. L'incorporazione di ^3H -metil timidina viene misurata mediante conteggio a β -scintillazione, in disintegrazione per minuto (DPM). L'incorporazione di ^{125}I -iododeossiridina viene misurata mediante conteggio dello ^{125}I ed espressa ugualmente in DPM. A seconda dell'approccio usato, l'incorporazione viene espressa in DPM/topo (sistema del singolo animale) o DPM/gruppo di trattamento (sistema del gruppo di trattamento).

LLNA ridotto

28. In alcune situazioni, quando c'è l'esigenza regolamentare di confermare una previsione negativa di potenziale irritazione cutanea, si può ricorrere a un protocollo rLLNA opzionale (16) (17) (18) che prevede l'utilizzo di un numero inferiore di animali, purché siano rispettate tutte le altre specifiche del protocollo LLNA riportate in questo metodo di prova. Prima di ricorrere all'approccio rLLNA, devono essere fornite giustificazioni chiare e precise motivazioni scientifiche. Se si ottiene un risultato positivo o equivoco, può essere necessario effettuare altri saggi per interpretare o chiarire il risultato.

29. La riduzione del numero di gruppi di trattamento è l'unica differenza tra il protocollo del metodo LLNA e quello del metodo rLLNA; per tale ragione l'rLLNA non fornisce informazioni sul rapporto dose-risposta. Di conseguenza, l'rLLNA non deve essere usato allorché si devono raccogliere tali informazioni. Come l'LLNA effettuato con più dosi, la concentrazione della sostanza sperimentale valutata nell'rLLNA deve essere la concentrazione massima che non induce palese tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea a livello locale nel topo (cfr. il punto 18).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

30. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (37).

Peso corporeo

31. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre determinare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

32. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. Se si utilizza l'approccio a singolo animale, l'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi delle DPM per topo calcolate per ogni gruppo di trattamento, compreso il gruppo di controllo positivo, per le medie delle DPM per topo calcolate per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno. Se si applica il sistema del gruppo di trattamento, l'indice di stimolazione si ottiene dividendo l'incorporazione radioattiva per ciascun gruppo di trattamento per l'incorporazione del gruppo di controllo trattato con veicolo; si ottiene così un SI medio.
33. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione $SI \geq 3$. Tuttavia, per determinare se un risultato borderline vada considerato positivo possono anche essere utilizzati la potenza della dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi (4)(5)(6).
34. Qualora sia necessario chiarire i risultati ottenuti, occorre prendere in considerazione diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (7).
35. La raccolta di dati sulla radioattività a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo VC parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati "aberranti").

DATI E RELAZIONE

Dati

36. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella. Se si utilizza il sistema del singolo animale, si evidenziano i valori delle disintegrazioni per minuto (DPM) per ciascun animale, i valori DPM medi per gruppo e individuali, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo con veicolo parallelo. Se si utilizza il sistema del gruppo di trattamento, si evidenziano i valori medio/mediano delle DPM e il valore medio degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo con veicolo parallelo.

Relazione sull'esecuzione del saggio

37. La relazione sull'esecuzione del saggio deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

- dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);

- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

- dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);
- giustificazione per la scelta del veicolo;

Animali sperimentali

- origine dei topi del ceppo CBA;
- condizioni microbiologiche degli animali, se note;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

- dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;
- giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito);
- concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);
- dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;
- metodi di misurazione della tossicità;
- criteri per considerare gli studi positivi o negativi;
- dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

- riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usati;
- dati sui controlli positivi e negativi, paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;
- se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

- peso dei singoli topi all'inizio dell'applicazione delle dosi e alla soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;
- momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'irritazione cutanea nel punto di applicazione, per ciascun animale;
- tabella dei valori di DPM individuali (sistema del singolo animale) o valori medi/mediani (sistema del gruppo di trattamento) e dei valori degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di trattamento;

- termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per DPM/animale per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento se si ricorre al sistema del singolo animale;
- indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo, se si ricorre al sistema del singolo animale;
- rapporto dose-risposta;
- analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

- breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OCSE (2002), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*. OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), *Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay*, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (13) OCSE (1992), *Skin Sensitisation*. OCSE Guideline for Testing of Chemicals No 406, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (14) OCSE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OCSE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OCSE Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>]

- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OCSE (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OCSE Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm
- (37) OCSE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Appendice 1

Standard di prestazione per la valutazione di metodi di prova LLNA simili o modificati proposti per l'irritazione cutanea

INTRODUZIONE

1. Scopo degli standard di prestazione (PS) è comunicare il fondamento in base al quale è possibile determinare nuovi metodi di prova, considerati o meno proprietari (ossia tutelati dal diritto d'autore, contrassegnati da marchio, registrati), per avere un'accuratezza e un'affidabilità sufficienti per specifici scopi sperimentali. Tali standard di prestazione, basati su metodi di prova convalidati e accettati, possono essere impiegati per valutare l'affidabilità e l'accuratezza di altri metodi simili (definiti metodi "strutturalmente analoghi"), basati su principi scientifici analoghi, e per misurare o prevedere lo stesso effetto biologico o tossico (14).
2. Prima dell'adozione di un metodo modificato (ossia di potenziali miglioramenti proposti rispetto a un metodo di prova approvato), si dovrebbe effettuare una valutazione per stabilire l'effetto delle modifiche proposte sulla prestazione del saggio e la portata di tali modifiche sulle informazioni disponibili per le altre componenti del processo di convalida. A seconda del numero e della natura delle modifiche proposte, dei dati generati e della documentazione giustificativa di tali modifiche, queste ultime devono essere sottoposte al medesimo processo di convalida descritto per un nuovo saggio o, se del caso, a una valutazione ristretta dell'affidabilità e della pertinenza, sulla scorta di un PS consolidato (14).
3. I metodi simili o le varianti di tali metodi, proposti nel quadro del presente metodo di prova, devono essere valutati per stabilirne l'affidabilità e l'accuratezza, con l'impiego di sostanze chimiche che rappresentano l'intervallo completo dei punteggi di irritazione dell'LLNA. Per evitare un uso ingiustificato degli animali si raccomanda vivamente agli sviluppatori del modello di consultare le autorità competenti prima di iniziare gli studi di convalida, in conformità con il PS e gli orientamenti forniti nell'ambito del presente metodo di prova.
4. Gli standard di prestazione qui specificati fanno riferimento ai seguenti standard armonizzati, usati per valutare la validità di versioni simili o modificate dell'LLNA: US-ICCVAM, EC-ECVAM e Japanese-JaCVAM (12). Il PS consiste di componenti essenziali del metodo di prova, sostanze chimiche di riferimento raccomandate e standard per l'accuratezza e l'affidabilità che il metodo proposto dovrebbe soddisfare o superare.

I. Componenti essenziali del metodo di prova

5. Per garantire che un metodo LLNA simile o modificato sia funzionalmente e meccanicamente analogo all'LLNA e misuri il medesimo effetto biologico, nel protocollo del metodo di prova devono essere inserite le seguenti componenti:

- la sostanza sperimentale deve essere applicata a livello locale su entrambe le orecchie del topo;
- la proliferazione dei linfociti deve essere misurata nei linfonodi drenanti dal sito di applicazione della sostanza sperimentale;
- la proliferazione dei linfociti deve essere misurata durante la fase di induzione dell'irritazione cutanea;
- per le sostanze sperimentali, la dose più elevata selezionata dovrebbe essere la concentrazione massima che non induce tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea locale nel topo. Per le sostanze chimiche di riferimento positive, la dose massima dovrebbe essere almeno la stessa dei valori EC3 LLNA delle corrispondenti sostanze di riferimento (cfr. la tabella 1) senza produrre tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea locale nel topo;
- in ogni studio deve essere inserito un controllo trattato con veicolo (VC) parallelo e, se del caso, dovrebbe essere usato anche un controllo positivo parallelo;
- devono essere usati almeno quattro animali per gruppo di trattamento;
- possono essere raccolti dati individuali o aggregati.

Se uno qualsiasi di tali criteri non è soddisfatto, gli standard di riferimento non possono essere usati per convalidare il metodo simile o modificato.

II. Elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento

6. Gli standard armonizzati US-ICCVAM, EC-ECVAM e Japanese-JaCVAM (12) identificano un minimo di 18 sostanze chimiche di riferimento obbligatorie e 4 sostanze di riferimento facoltative (ossia sostanze che hanno prodotto risultati falsi positivi o falsi negativi nell'LLNA rispetto ai risultati ottenuti sull'uomo o sui porcellini d'India (B.6 o OCSE Test Guideline 406) (13), e pertanto offrono l'opportunità di dimostrare un rendimento uguale o migliore rispetto all'LLNA), che sono incluse nello standard di prestazione dell'LLNA. I criteri di selezione per individuare tali sostanze chimiche sono:

- l'elenco delle sostanze chimiche di riferimento conteneva i tipi di sostanze che solitamente vengono testate per il loro potenziale di irritazione cutanea e la gamma di risposte che l'LLNA è in grado di misurare o prevedere;
- le sostanze possedevano strutture chimiche ben definite;
- per ogni sostanza erano disponibili dati dell'LLNA ottenuti da saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13) e (se del caso) dati ottenuti dall'uomo;
- le sostanze potevano essere facilmente reperite sul mercato.

Le sostanze chimiche di riferimento raccomandate sono elencate nella tabella 1. Gli studi che utilizzano le sostanze chimiche di riferimento proposte devono essere valutati nel veicolo con cui sono elencate nella tabella 1. Nell'eventualità in cui una sostanza elencata non sia disponibile, con un'adeguata giustificazione possono essere usate altre sostanze che soddisfano i criteri di selezione menzionati.

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per lo standard di Prestazione dell'LLNA

Numero	Sostanze chimiche (1)	CAS	Forma	Veic. (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Gamma EC3 effettiva	LLNA vs. GP	LLNA vs. uomo
1	5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one (CMI)/2-metil-4-isotiazolin-3-one (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	Liq.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenilediammina	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloruro di cobalto	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenolo	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citrale	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenolo	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenil benzoato	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alcol cinnamico	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil urea	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metilmetacrilato	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzene	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
15	Isopropanolo	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Acido lattico	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
17	Salicilato di metile	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Acido salicilico	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Numero	Sostanze chimiche ⁽¹⁾	CAS	Forma	Veic. ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Gamma EC3 effettiva	LLNA vs. GP	LLNA vs. uomo
Sostanze opzionali per dimostrare un migliorato rendimento relativo all'LLNA										
19	Laurilsolfato di sodio	151-21-3	Sol.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Etilene glicol dimetacrilato	97-90-5	Liq.	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Xilene	1330-20-7	Liq.	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ ^(**)	+/-
22	Cloruro di nichel	7718-54-9	Sol.	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Abbreviazioni: AOO = acetone: olio di oliva (4:1, v/v); CAS = Chemical Abstracts Service Number; DMF = N,N-dimetilformammide; DMSO = dimetilsolfossido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenzene; EC3 = concentrazione stimata necessaria a produrre un indice di stimolazione pari a 3; GP = risultato del saggio sul porcellino d'India (ossia B. 6 o OCSE Test Guideline 406) (13); HCA = aldeide esil cinnamica; Liq = liquido; LLNA = risultato del saggio local lymph node assay eseguito sui topi (ossia B. 42 o OCSE Test Guideline 429) (1); MEK = metiletichetone; NA = non applicabile perché l'indice di stimolazione < 3; NC = non calcolato perché i dati sono stati ottenuti da un unico studio; Sol = solido; Veic. = veicolo del saggio.

(*) Si presume che sia un non irritante nell'uomo, per il fatto che non sono stati raccolti risultati da saggi epicutanei clinici, la sostanza non è stata inclusa come allergene in kit di saggi epicutanei e non sono stati segnalati casi di irritazione nell'uomo.

(**) non sono disponibili dati raccolti da saggi condotti su porcellini d'India.

(1) Le sostanze chimiche devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

(2) A causa del potenziale impatto di veicoli diversi sul rendimento dell'LLNA, per ogni sostanza di riferimento deve essere utilizzato il veicolo raccomandato (24)(32).

(3) Valori medi nel caso in cui fossero disponibili più valori EC3. Per le sostanze negative (ossia con indice di stimolazione < 3) è fornita la concentrazione più elevata testata).

(4) Numero di studi LLNA da cui sono stati ottenuti dati.

(5) Disponibile in commercio con la denominazione Kathon CG (CAS 55965-84-9), che è una miscela 3:1 di CMI e MI. Le concentrazioni relative di ciascuna componente vanno dall'1,1 % all'1,25 % (CMI) e dallo 0,3 % allo 0,45 % (MI). Le componenti inattive sono sali di magnesio (dal 21,5 % al 24 %) e nitrato rameico (dallo 0,15 % allo 0,17 %), con la rimanente formulazione dal 74 % al 77 % d'acqua. Kathon CG è messa a disposizione da Sigma-Aldrich e da Rohm and Haas (ora Dow Chemical Corporation).

III. Standard di affidabilità e accuratezza definiti

7. L'accuratezza di un metodo simile o modificato rispetto all'LLNA deve soddisfare o superare gli standard di prestazione dell'LLNA allorché è valutata sulla base delle 18 sostanze di riferimento minime che è obbligatorio utilizzare. Il metodo nuovo o modificato deve poter essere classificato correttamente sulla base di una decisione "sì/no". Tuttavia, il metodo nuovo o modificato potrebbe non classificare correttamente tutte le sostanze chimiche di riferimento minime che devono essere utilizzate. Se, per esempio, uno degli irritanti deboli fosse erroneamente classificato, per dimostrare un rendimento equivalente si potrebbe considerare l'opportunità di spiegarne l'errata classificazione e di fornire dati supplementari adeguati (ad esempio, risultati di saggi che forniscono classificazioni corrette per altre sostanze con proprietà fisiche, chimiche e irritanti simili a quelle della sostanza chimica di riferimento in questione). In questi casi, lo stato di convalida del metodo di prova LLNA nuovo o modificato sarebbe valutato caso per caso.

Riproducibilità all'interno del laboratorio di prova

8. Per stabilire la riproducibilità all'interno del laboratorio che ha eseguito il saggio, un metodo LLNA nuovo o modificato dovrebbe essere valutato utilizzando una sostanza irritante ben caratterizzata nell'LLNA. Pertanto, gli standard di riferimento dell'LLNA sono basati sulla variabilità dei risultati da saggi ripetuti dell'aldeide esil cinnamica (HCA). Al fine di valutare l'affidabilità all'interno del laboratorio che ha eseguito il saggio, i valori soglia della concentrazione stimata (EC_t) per l'HCA devono essere ottenuti in quattro distinte occasioni, lasciando trascorrere almeno una settimana tra ciascun test. Una riproducibilità accettabile all'interno del laboratorio è indicata dalla capacità del laboratorio di ottenere, per ciascun saggio con l'HCA, valori EC_t compresi tra il 5 % e il 20 %, che rappresentano un intervallo di 0,5-2,0 volte il valore EC₃ medio specificato per l'HCA (10 %) nell'LLNA (cfr. la tabella 1).

Riproducibilità tra laboratori

9. Per stabilire la riproducibilità tra laboratori di un metodo LLNA nuovo o modificato si dovrebbero utilizzare due sostanze irritanti ben caratterizzate nell'LLNA. Gli standard di prestazione dell'LLNA dipendono dalla variabilità dei risultati dei saggi condotti con l'HCA e il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) in laboratori diversi. I valori EC_t devono essere ottenuti in maniera indipendente da un unico studio condotto in almeno tre laboratori distinti. Per dimostrare una riproducibilità accettabile tra laboratori, ogni laboratorio dovrebbe ottenere valori EC_t del 5 % fino al 20 % per l'HCA e dello 0,025 % fino allo 0,1 % per il DNCB, che rappresentano l'intervallo di 0,5-2,0 volte le concentrazioni EC₃ medie specificate per l'HCA (10 %) e il DNCB (0,05 %), rispettivamente, nell'LLNA (cfr. la tabella 1).

Appendice 2

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 rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con "concordanza", per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (14).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonte o fonti coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Soglia di concentrazione stimata (EC_t): concentrazione stimata di una sostanza di prova necessaria a produrre un indice di stimolazione indicativo di una risposta positiva.

Concentrazione stimata tre (EC₃): concentrazione stimata di una sostanza di prova necessaria a produrre un indice di stimolazione pari a tre.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva.

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva.

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando la stessa sostanza di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (14).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: la misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (14).

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento convalidato e accettato. Tale metodo di prova potrebbe essere candidato a convalide accelerate (catch-up validation). Usato in maniera intercambiabile con un metodo di prova simile (14).

Osservazione aberrante: un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Standard di prestazione (PS): standard basati su un metodo di riferimento convalidato, 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; ii) un elenco minimo di sostanze di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare l'accettabilità delle prestazioni del metodo di riferimento convalidato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento convalidato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (14).

Metodo di prova proprietario: un metodo di prova la cui fabbricazione e distribuzione è limitata da brevetti, diritti d'autore, marchi ecc.

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti da coloro che eseguono le prove.

Sostanze chimiche di riferimento: sostanze chimiche selezionate per essere utilizzate nella procedura di convalida, di cui sono già note le risposte nel sistema di prova di riferimento in vitro o in vivo o le specie di interesse. Tali sostanze chimiche dovrebbero essere rappresentative delle classi di sostanze chimiche per le quali si prevede di utilizzare il metodo di prova, e dovrebbero rappresentare l'intera gamma di risposte prevedibili delle sostanze chimiche per le quali il metodo di prova può essere usato, ossia da forte a debole a negativa. Gruppi diversi di sostanze di riferimento possono essere richiesti per le diverse fasi del processo di convalida e per i diversi metodi di prova e utilizzi della prova (14).

Pertinenza: descrizione del rapporto del saggio con l'effetto di interesse e se esso è significativo e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui il saggio misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (14).

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (14).

Irritazione cutanea: un processo immunologico che si verifica quando un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Metodo di prova convalidato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di convalida per determinare la rilevanza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova convalidato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato (14).»

2) Il capitolo B.46 è sostituito dal seguente:

«B.46. IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO: TEST SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA

INTRODUZIONE

1. Per irritazione cutanea si intende la comparsa di lesioni reversibili della pelle in seguito all'applicazione della sostanza di prova per un massimo di 4 ore [secondo la definizione del *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – Sistema generale armonizzato di classificazione ed etichettatura dei prodotti chimici (GHS) delle Nazioni Unite e del 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 (regolamento CLP) (1)(3)]. Il presente metodo di prova (TM) propone una procedura in vitro che può essere utilizzata per individuare il rischio di sostanze irritanti (sostanze e miscele) corrispondenti alla categoria 2 del GHS delle Nazioni Unite e del regolamento CLP dell'UE (1) (2) (3). Nell'UE e in altre regioni, che non hanno adottato la categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite (lievi irritanti), questo metodo può anche essere impiegato per individuare sostanze chimiche non classificate (sostanze "senza categoria" del GHS delle Nazioni Unite e del CLP dell'UE) (1)(3). Infine, il presente metodo può essere usato per determinare il potere di irritazione cutanea delle sostanze e costituire un test sostitutivo a se stante per un test di irritazione cutanea in vivo nel quadro di una strategia di prova sequenziale (4 e capitolo B.4 del presente allegato).

2. Tradizionalmente, la valutazione dell'irritazione cutanea implicava il ricorso ad animali di laboratorio [linea guida OCSE Test Guideline 404; capitolo B.4 del presente allegato](4). Per via delle preoccupazioni legate al benessere degli animali, nel 2004 il metodo B.4 è stato rivisto per consentire di determinare la corrosione/irritazione cutanea tramite una strategia di prova sequenziale, ricorrendo a metodi in vitro o ex vivo convalidati, onde evitare di causare sofferenze agli animali. Sono stati adottati tre metodi per i test in vitro convalidati come linee guida OCSE Test Guidelines 430, 431 e 435 (5) (6) (7); di questi, due sono stati inseriti come capitoli B.40 e B.40 bis del presente allegato, da utilizzare per determinare la corrosività della strategia di prova sequenziale proposta dal metodo B.4 o dalla linea guida OCSE Test Guideline 404 (4).
3. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana dell'irritazione cutanea. Il metodo si basa su epidermide umana ricostruita (RhE), che riproduce fedelmente le proprietà biochimiche e fisiologiche degli strati superiori della pelle umana (l'epidermide) nella struttura generale (uso di cheratinociti prelevati da epidermide umana non trasformati come origine per le cellule, tessuto e citoarchitettura rappresentativi). Il presente metodo è costituito inoltre da un insieme di standard di prestazione (PS) (appendice 2) per la valutazione di metodi simili basati su epidermide umana ricostituita o di varianti di tali metodi sviluppati dall'EC-ECVAM (8), in conformità ai principi del documento orientativo dell'OCSE n. 34 (OCSE Guidance Document No. 34) (9).
4. Esistono tre metodi convalidati conformi al presente metodo di prova. Sono stati svolti studi di prevalidazione, ottimizzazione e validazione per un metodo di prova in vitro (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), disponibile sul mercato con la denominazione EpiSkin™ (denominato metodo di riferimento convalidato o VRM), utilizzando modelli di epidermide umana ricostituita (RhE). Due ulteriori metodi di prova in vitro per l'irritazione cutanea basati sull'epidermide umana ricostituita, disponibili in commercio, sono stati convalidati conformemente agli standard di prestazione e danno risultati simili al metodo di riferimento convalidato (21). Si tratta del metodo EpiDerm™ SIT (EPI-200) e del metodo SkinEthic™ RHE (22).
5. Prima di poter utilizzare a fini normativi un test basato su un modello di epidermide umana in vitro simile al metodo di riferimento convalidato, a EpiDerm™ SIT (EPI-200) o a SkinEthic™, oppure una variante di tali metodi, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto, al fine di assicurare che il test sia comparabile con il metodo di riferimento convalidato, come previsto dai requisiti degli standard di prestazione definiti nel presente metodo (appendice 2). Inoltre, prima di sviluppare e convalidare un metodo basato su un modello di epidermide umana in vitro e di presentarlo ai fini dell'adozione da parte delle autorità normative, si raccomanda di consultare il documento esplicativo generale dell'OCSE sulle prove di irritazione cutanea in vitro (23).

DEFINIZIONI

6. Le definizioni utilizzate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

7. Uno dei limiti del metodo di prova, evidenziato anche dallo studio di convalida (16), è che esso non consente di classificare le sostanze nella categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite (lievi irritanti) (1). Se il metodo è impiegato come test sostitutivo parziale, può essere necessario effettuare test in vivo di follow-up per caratterizzare pienamente il potenziale di irritazione cutanea (4 e capitolo B.4 del presente allegato). È riconosciuto che l'uso di pelle umana è soggetto a considerazioni e condizioni di carattere etico a livello nazionale e internazionale.
8. Il presente metodo riguarda la componente in vitro dell'irritazione cutanea della strategia di prova sequenziale del metodo B.4 (OCSE Test Guideline 404) sulla corrosione/irritazione cutanea (4). Se da un lato il metodo non fornisce informazioni adeguate in merito alla corrosione cutanea, dall'altro lato va detto che il metodo B.40 bis (OCSE Test Guideline 431) sulla corrosione cutanea ricorre al medesimo sistema di prova con modelli di epidermide umana ricostituita, sia pur sulla base di un diverso protocollo (capitolo B.40 bis). Il metodo in esame si basa su modelli di epidermide umana ricostituita utilizzando cheratinociti umani, che pertanto rappresentano in vitro l'organo bersaglio della specie di interesse. Oltretutto, esso riguarda direttamente la fase iniziale dell'attivazione della cascata infiammatoria/meccanismo d'azione (danno cellulare e tissutale dovuti a traumi localizzati) che si verifica durante l'irritazione in vivo. Nella procedura di convalida sottesa al presente metodo di prova è stata testata un'ampia gamma di sostanze chimiche e la banca dati empirica dello studio di convalida conteneva complessivamente 58 sostanze (16)(18)(23). Si trattava di 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 ancora stati valutati nell'ambito di uno studio di convalida (24). Se non si può escludere che tali sostanze possano essere testate utilizzando la tecnologia RhE, l'attuale metodo di prova non prevede l'esecuzione di prove per gas e aerosol. Occorre precisare inoltre che sostanze chimiche molto colorate potrebbero interferire con le misurazioni della vitalità cellulare e rendono necessario l'utilizzo di controllo adattati per le correzioni (cfr. i punti 24-26).
9. Un singolo ciclo di prove costituito da tre tessuti replicati dovrebbe essere sufficiente per una sostanza sperimentale, se la classificazione è univoca. Tuttavia, in caso di risultati borderline, tra cui misurazioni replicate discordanti e/o una vitalità percentuale media pari a $50 \pm 5\%$, si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire un secondo ciclo di prove, oltre che un terzo nell'eventualità di risultati discordanti tra i primi due cicli.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. La sostanza 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 disposte in modo analogo a quelle presenti in vivo.

11. L'irritazione cutanea indotta dalle sostanze chimiche, manifestata da eritema ed edema, scaturisce da una cascata di eventi che iniziano con la penetrazione nello strato corneo e con lesioni ai sottostanti strati di cheratinociti. Morendo, i cheratinociti rilasciano mediatori che scatenano la cascata infiammatoria, la quale agisce sulle cellule del derma, in particolare sulle cellule stromali ed endoteliali. Sono la dilatazione e l'accresciuta permeabilità delle cellule endoteliali a produrre l'eritema e l'edema (24). I metodi basati sull'epidermide umana ricostituita rilevano gli eventi iniziali della cascata.
12. 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 bromide, tiazolil blu; numero CAS 298-93-1 in un sale, il blu di formazan, misurato quantitativamente dopo l'estrazione dai tessuti (25). Le sostanze irritanti sono identificate per la loro capacità di diminuire la vitalità cellulare al di sotto di determinati livelli soglia (ossia $\leq 50\%$, per gli irritanti appartenenti alla categoria 2 del sistema GHS delle Nazioni Unite/CLP dell'UE). A seconda del quadro regolamentare in cui sono usati i risultati del presente metodo di prova, le sostanze che danno vitalità cellulare superiore al livello soglia definito possono essere considerate non irritanti ($> 50\%$, senza categoria).

DIMOSTRAZIONE DEL RENDIMENTO

13. Prima di utilizzare sistematicamente uno dei tre metodi convalidati conformi al presente metodo di prova, è consigliabile che i laboratori ne verifichino il rendimento tecnico, utilizzando le dieci sostanze di riferimento elencate nella tabella 1. Per metodi analoghi messi a punto conformemente a questo metodo o per modifiche dei metodi convalidati occorre applicare gli standard di prestazione descritti nell'appendice 2 del presente metodo, prima di utilizzarli a fini regolamentari.
14. Nell'ambito della verifica del rendimento, 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 è consolidato e la sua correttezza d'impiego è stata dimostrata, non è più necessario effettuare la verifica in maniera routinaria. Tuttavia, se un metodo viene utilizzato di routine, si raccomanda di continuare a verificare le proprietà di barriera a intervalli regolari.

Tabella 1

Sostanze di riferimento ⁽¹⁾

Sostanza	CAS	Punteggio in vivo ⁽²⁾	Stato fisico	Categoria GHS ONU/CLP UE
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⁾ , ⁽⁴⁾
salicilato di esile	6259-76-3	2	Liquido	Senza cat. (Cat. opzionale 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
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⁾ Queste sostanze di riferimento sono un sottoinsieme delle sostanze di riferimento usate nello studio di convalida.

⁽²⁾ Punteggio in vivo ai sensi del metodo B.4 e di OCSE Test Guideline 404 ⁽⁴⁾.

⁽³⁾ Nell'ambito del presente metodo di prova, la categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite (lievi irritanti) ⁽¹⁾ è considerata una sostanza "senza categoria".

⁽⁴⁾ La categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite non si applica nell'ambito del regolamento CLP dell'UE.

PROCEDURA

15. Di seguito sono descritte le componenti e le procedure di un metodo su modello di epidermide umana ricostituita per la valutazione del potere di irritazione cutanea. Il modello dovrebbe essere ricostruito e può essere preparato internamente o acquistato sul mercato. Le procedure operative standard (SOP) per i modelli EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE sono disponibili (26)(27)(28). I test devono essere svolti come descritto di seguito.

Componenti del modello di epidermide umana ricostituita*Condizioni generali del modello*

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 dei marcatori tossici, ad esempio, sodio dodecil solfato (SDS) o Triton X-100. La funzione di barriera deve essere dimostrata e può essere valutata la concentrazione alla quale un marcatore riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC₅₀) dopo un tempo di esposizione fisso oppure determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % (ET₅₀) dopo l'applicazione del marcatore ad una concentrazione fissa predeterminata. Le proprietà di contenimento del modello devono essere tali da impedire il passaggio delle sostanze presenti attorno allo strato corneo verso i tessuti vitali, che inciderebbe negativamente sulla qualità della modellizzazione dell'esposizione cutanea. Il modello di pelle umana non deve essere contaminato da batteri, virus, micoplasmi o funghi.

Condizioni funzionali del modello

Vitalità

17. Il saggio usato per la determinazione della vitalità è il test basato sull'MTT (25). Gli utilizzatori del modello devono accertarsi che ciascun lotto del modello impiegato soddisfi i criteri definiti per il controllo negativo (NC). La densità ottica (OD) del solo solvente di estrazione dovrebbe essere sufficientemente bassa, ossia OD < 0,1. Lo sviluppatore/il fornitore del modello stabilisce un intervallo di accettabilità (limite superiore e inferiore) per i valori OD del controllo negativo (nelle condizioni del metodo di prova dell'irritazione cutanea); gli intervalli di accettabilità per i tre metodi convalidati figurano nella tabella 2. Occorre documentare che i tessuti trattati con il controllo negativo sono stabili in coltura (ossia presentano misure di vitalità simili) nel corso del periodo di esposizione.

Tabella 2

Intervalli di accettabilità dei valori OD del controllo negativo

	Limite di accettazione inferiore	Limite di accettazione superiore
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Funzione barriera

18. Lo strato corneo e la relativa composizione lipidica devono essere sufficienti per resistere alla penetrazione rapida dei marcatori citotossici, come SDS o Triton X-100, valutata tramite i fattori IC₅₀ o ET₅₀ (tabella 3).

Morfologia

19. L'esame istologico del modello di epidermide umana ricostituita deve essere svolto in modo da dimostrare che la struttura è analoga all'epidermide umana (compreso lo strato corneo multiplo).

Riproducibilità

20. I risultati del controllo positivo (PC) e dei controlli negativi (NC) del metodo devono mostrare la riproducibilità nel tempo.

Controllo di qualità (QC)

21. Lo sviluppatore/fornitore del modello di epidermide deve garantire e dimostrare che ogni lotto del modello utilizzato rispetta determinati criteri di fabbricazione, i più rilevanti dei quali sono quelli relativi alla *vitalità* (punto 17), alla *funzione di barriera* (punto 18) e alla *morfologia* (punto 19). Tali informazioni devono essere fornite agli utilizzatori del metodo, perché possano inserirle nella relazione di prova. È opportuno che lo sviluppatore/il fornitore del modello di cute (o il ricercatore qualora si usi un modello prodotto internamente) stabilisca 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 idonei. A titolo di esempio, nella tabella 3 sono riportati gli intervalli di accettabilità per i tre metodi convalidati.

Tabella 3

Esempi di criteri di QC dei lotti

	Limite di accettabilità inferiore	Limite di accettabilità superiore
EpiSkin™ (SM) (trattamento di 18 ore con SDS)(26)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(27)	$ET_{50} = 4,8 \text{ ore}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ ore}$
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(28)	$ET_{50} = 4,0 \text{ ore}$	$ET_{50} = 9,0 \text{ ore}$

Applicazione delle sostanze di prova e delle sostanze di controllo

22. Per ogni sostanza sperimentale e per i controlli devono essere utilizzate almeno tre repliche di tessuto per prova. Per le sostanze 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 $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ o $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. 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. Al termine del periodo di esposizione, la sostanza di prova deve essere tolta con cura dalla superficie dell'epidermide utilizzando un tampone acquoso o NaCl allo 0,9 %. In funzione del metodo RhE convalidato, il periodo di esposizione può variare da 15 a 60 minuti e la temperatura di incubazione da 20 a 37 °C. Questi periodi di esposizione e queste temperature sono ottimizzati per ciascun metodo basato su modelli di epidermide umana ricostituita e rappresentano le diverse proprietà intrinseche dei metodi; per maggiori dettagli consultare le procedure operative standard (SOP) per i tre metodi (26)(27)(28).
23. Occorre utilizzare simultaneamente controlli negativi (NC) e controlli positivi (PC) per ogni studio al fine di dimostrare che la vitalità (nell'NC), la funzione di barriera e la conseguente sensibilità (con il PC) dei tessuti rientrano in un intervallo di accettabilità storico determinato. La sostanza PC consigliata è una soluzione acquosa di SDS al 5 %. Le sostanze NC consigliate sono acqua o un tampone fosfato salino (PBS).

Misurazione della vitalità cellulare

24. L'elemento più importante del protocollo di prova è che le misure della vitalità non siano svolte immediatamente dopo l'esposizione alle sostanze 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. La fase di ottimizzazione del test (11) (12) (13) (14) (15) ha dimostrato che un periodo di incubazione post-trattamento di 42 ore è ottimale.
25. Il saggio MTT è un metodo quantitativo convalidato che dovrebbe essere utilizzato 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 inserito in una soluzione MTT alla concentrazione adeguata (ad esempio, 0,3-1 mg/mL) per 3 ore. Il precipitato di formazan blu che si forma è successivamente estratto dal tessuto con un solvente (ad esempio, isopropanolo o con una soluzione isopropanolo/HCl 95:5), e ne viene misurata la concentrazione determinando la densità ottica a 570 nm con una banda passante massima di $\pm 30 \text{ nm}$.
26. Le proprietà ottiche della sostanza in esame o la sua azione chimica sull'MTT potrebbero interferire con la prova, causando una stima errata della vitalità (perché la sostanza in esame potrebbe impedire o annullare la generazione di colore, oltre a causarla). Questo può verificarsi quando una specifica sostanza non viene completamente rimossa dal tessuto con il risciacquo o quando penetra nell'epidermide. Se la sostanza in esame agisce direttamente sull'MTT (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 di prova con la tecnica di misurazione della vitalità. Per una descrizione dettagliata di come correggere la riduzione diretta dell'MTT e le interferenze da parte degli agenti coloranti consultare le SOP dei metodi di riferimento convalidati (26)(27)(28).

Criteria di accettabilità

27. Per ogni metodo svolto utilizzando lotti di modelli di epidermide validi (cfr. il punto 21), i tessuti trattati con 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. I valori di OD dei controlli non devono essere inferiori ai limiti storici stabiliti. Allo stesso modo, i tessuti trattati con il controllo positivo, ossia soluzione acquosa di SDS al 5 %, devono riflettere la capacità dei tessuti di rispondere ad una sostanza irritante nelle condizioni del metodo di prova (26) (27) (28). È necessario definire misure correlate e adeguate di variabilità tra le repliche di tessuto (ad esempio, se vengono usate deviazioni standard, devono rientrare nell'intervallo di confidenza unilaterale al 95 %, calcolato da dati storici; per il metodo di riferimento convalidato le deviazioni standard devono essere < 18 %).

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

28. I valori di OD ottenuti per ciascun campione di prova possono essere utilizzati per calcolare la percentuale di vitalità normalizzata rispetto al controllo negativo, il cui valore è fissato al 100 %. Il valore limite della percentuale di vitalità cellulare in base al quale si stabilisce la distinzione tra sostanze irritanti e sostanze non classificate e 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. I valori limite per la previsione di irritazione sono riportati di seguito:

- La sostanza in esame è considerata irritante per la pelle conformemente alla categoria 2 del sistema GHS/CLP se la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è inferiore o uguale (\leq) al 50 %.
- A seconda del quadro regolamentare in cui sono usati i risultati del presente metodo di prova, la sostanza di prova è considerata come non irritante per la cute (corrispondente alla voce "senza categoria" del sistema GHS/CLP) se la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è superiore ($>$) al 50 %.

DATI E RELAZIONI

Dati

29. 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 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 \pm la deviazione standard. Per ogni sostanza testata devono essere segnalate le interazioni osservate tra il reagente MTT e le sostanze in esame colorate.

Relazione sull'esecuzione della prova

30. La relazione deve comprendere i seguenti dati:

Sostanze di prova e sostanze di controllo

- denominazioni chimiche, quali il nome e il numero CAS, il nome e il numero CE, se noti;
- purezza e composizione della sostanza (in percentuale ponderale);
- proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio (ad esempio, natura fisica, stabilità e volatilità, pH e solubilità in acqua, se nota);
- trattamento delle sostanze di prova/controllo prima del test, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);
- condizioni di conservazione;

Giustificazione per la scelta del modello di epidermide umana ricostituita e del metodo utilizzati

Condizioni di prova

- sistema cellulare utilizzato;
- informazioni complete sul modello di epidermide specifico utilizzato e sulla sua efficienza. Esse dovrebbero includere (elenco non esauriente):
 - i) vitalità;
 - ii) funzione di barriera;
 - iii) morfologia;
 - iv) riproducibilità e predittività;
 - v) controlli di qualità (QC) del modello;
- dettagli del protocollo utilizzato;
- dosaggi usati per il test, durata dell'esposizione e del periodo di incubazione post-trattamento;
- descrizione di qualsiasi modifica del protocollo sperimentale;

- riferimenti a dati storici del modello. Essi dovrebbero includere (elenco non esauriente):
 - i) accettabilità dei dati di QC rispetto ai dati storici del lotto;
 - ii) accettabilità dei valori di controllo positivi e negativi rispetto alle medie e agli intervalli di controllo positivi e negativi;
- descrizione dei criteri di valutazione utilizzati, compresa la giustificazione per la scelta del valore o dei valori limite per il modello predittivo;
- riferimenti a dati storici del modello;

Risultati

- presentazione sotto forma di tabella dei dati ottenuti da singole sostanze sperimentali per ciascuna prova e per ciascuna misurazione della replica;
- indicazione dei controlli usati per riduttori dell'MTT diretti e/o sostanze sperimentali coloranti;
- descrizione di altri effetti osservati;

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the "Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards", issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) 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.
- (4) OCSE (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) OCSE (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) OCSE (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) OCSE (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (9) OCSE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OCSE Series on Testing and Assessment No. 34, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765-770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests, *ALTEX* 21, 107-114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA* 33, 351-367.

- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (23) OCSE (2010), Explanatory background document to the OCSE draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OCSE Series on Testing and Assessment, No. 137, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.
- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.
- (26) EpiSkinTM SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkinTM test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDermTM SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDermTM skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthicTM RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 *bis* test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) 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.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

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

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 rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con "concordanza" per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (9).

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

Concordanza: misura l'efficacia del metodo di prova per metodi che forniscono un risultato categorico e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato in modo intercambiabile con "accuratezza" ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze di prova che sono correttamente classificate come positive o negative. (9).

ET₅₀: può essere calcolato determinando il tempo di esposizione necessario per ridurre la vitalità cellulare del 50 % in seguito all'applicazione del marcatore ad una concentrazione specifica e fissa; cfr. anche IC₅₀.

EU CLP [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]: attua nell'Unione europea (UE) il sistema GHS delle Nazioni Unite per la classificazione e l'etichettatura delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) (3).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) delle Nazioni Unite (ONU): un sistema di classificazione delle 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).

IC₅₀: può essere calcolato per determinazione della concentrazione alla quale un marcatore riduce la vitalità dei tessuti del 50 % (IC₅₀) dopo un tempo di esposizione fisso, cfr. anche ET₅₀.

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

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento convalidato e accettato. Tale metodo di prova potrebbe essere candidato a convalide accelerate (catch-up validation). Usato in maniera intercambiabile con un metodo di prova simile (9).

Standard di prestazione (PS): standard basati su un metodo di riferimento convalidato, 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; ii) un elenco minimo di sostanze di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare l'accettabilità delle prestazioni del metodo di riferimento convalidato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento convalidato, 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).

Sostanze chimiche di riferimento: sostanze chimiche selezionate per essere utilizzate nella procedura di convalida, di cui sono già note le risposte nel sistema di prova di riferimento in vitro o in vivo o le specie di interesse. Tali sostanze chimiche dovrebbero essere rappresentative delle classi di sostanze chimiche per le quali si prevede di utilizzare il metodo di prova, e dovrebbero rappresentare l'intera gamma di risposte prevedibili delle sostanze chimiche per le quali il metodo di prova può essere usato, ossia da forte a debole a negativa. Gruppi diversi di sostanze di riferimento possono essere richiesti per le diverse fasi del processo di convalida e per i diversi metodi di prova e utilizzi della prova (9).

Pertinenza: descrizione del rapporto del saggio con l'effetto di interesse e se esso è significativo e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui il saggio misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (9).

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (9).

Prova di sostituzione: una prova progettata per sostituire un saggio usato routinariamente 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 (9).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze positive/attive 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).

Irritazione cutanea: comparsa di danni reversibili sulla pelle a seguito dell'applicazione della sostanza di prova per una durata massima di 4 ore. L'irritazione cutanea è una reazione locale, non immunogenica, che si manifesta poco dopo la stimolazione (29). 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).

Strategia di prova sequenziale: prove che ricorrono a metodi sperimentali in maniera sequenziale; i metodi di prova selezionati in ciascun livello consequenziale sono decisi in base ai risultati del precedente livello di prova (9).

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Standard di prestazione per la valutazione di metodi in vitro simili basati su epidermide umana ricostituita (RHE), o di varianti di tali metodi, proposti per le prove di irritazione cutanea

INTRODUZIONE

1. Scopo degli standard di prestazione (PS) è comunicare il fondamento in base al quale è possibile determinare nuovi metodi, soggetti o meno al diritto di proprietà (ossia tutelati dal diritto d'autore, contrassegnati da marchio, registrati), per avere un'accuratezza e un'affidabilità sufficienti per specifici scopi sperimentali. Tali standard di prestazione, basati su metodi di prova convalidati e accettati, possono essere impiegati per valutare l'affidabilità e l'accuratezza di altri metodi analoghi (definiti metodi "strutturalmente analoghi"), basati su principi scientifici simili, e per misurare o prevedere lo stesso effetto biologico o tossico (9).
2. Prima dell'adozione di un metodo modificato (ossia di potenziali miglioramenti proposti rispetto a un metodo approvato), si dovrebbe effettuare una valutazione per stabilire l'effetto delle modifiche proposte sulla prestazione del saggio e la portata di tali modifiche sulle informazioni disponibili per le altri componenti del processo di convalida. A seconda del numero e della natura delle modifiche proposte, dei dati generati e della documentazione giustificativa di tali modifiche, queste ultime devono essere sottoposte al medesimo processo di convalida descritto per un nuovo saggio o, se del caso, a una valutazione ristretta dell'affidabilità e della pertinenza, sulla scorta di un PS consolidato (9).
3. I metodi simili ("strutturalmente analoghi") rispetto ai tre metodi convalidati [EpiSkin™ (metodo di riferimento convalidato, VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE] o le varianti di tali metodi, proposti nel quadro del presente metodo di prova, devono essere valutati al fine di determinarne l'affidabilità e l'accuratezza utilizzando sostanze che rappresentano l'intervallo completo dei punteggi di irritazione di Draize. Se valutati utilizzando le 20 sostanze di riferimento consigliate dello standard di prestazione (tabella 1), i metodi simili proposti, o le varianti di tali metodi, devono avere valori di affidabilità e di accuratezza confrontabili o migliori rispetto a quelli ottenuti tramite il metodo di riferimento convalidato (tabella 2) (2) (16). I valori di affidabilità e accuratezza che dovrebbero essere raggiunti sono riportati nei punti da 8 a 12 della presente appendice. Le sostanze non classificate (ossia "senza categoria" nel sistema GHS/CLP) e classificate (nella categoria 2 del sistema GHS/CLP) (1) che rappresentano classi chimiche diverse sono incluse affinché i valori relativi all'affidabilità e all'accuratezza (sensibilità, specificità e accuratezza generale) del metodo proposto possano essere confrontati con quelli del metodo di riferimento convalidato. Prima di utilizzarlo per esaminare nuove sostanze determinare l'affidabilità del metodo e la sua capacità di individuare correttamente le sostanze irritanti di categoria 2 secondo il sistema GHS/CLP.

4. I presenti standard di prestazione sono basati sullo standard EC-ECVAM (8), aggiornato in conformità dei sistemi GHS dell'ONU e CLP dell'UE sulla classificazione e l'etichettatura (1) (3). Gli standard di prestazione originari erano stati definiti dopo il completamento dello studio di convalida (21) ed erano basati sul sistema di classificazione dell'UE previsto dalla 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 (1). In seguito all'adozione del sistema GHS delle Nazioni Unite per la classificazione e l'etichettatura nell'UE (regolamento CLP dell'UE) (3), avvenuta tra l'ultimazione dello studio di valutazione e il completamento del presente metodo di prova, gli standard di prestazione sono stati aggiornati (8). Tale aggiornamento consta prevalentemente di modifiche apportate: i) all'insieme delle sostanze di riferimento del PS; e ii) ai valori definiti per l'affidabilità e l'accuratezza (2) (23).

STANDARD DI PRESTAZIONE PER METODI DI PROVA R_{hE} IN VITRO PER L'IRRITAZIONE CUTANEA

5. Gli standard di prestazione sono costituiti dai seguenti tre elementi (9):

- I) componenti essenziali del metodo
- II) elenco minimo di sostanze di riferimento
- III) valori definiti di accuratezza e affidabilità

I) Componenti essenziali del metodo

6. Si tratta di elementi strutturali, funzionali e procedurali essenziali di un metodo convalidato che dovrebbero essere inclusi nel protocollo di un metodo proposto simile sotto il profilo meccanico e funzionale o di una sua variante. Tali componenti comprendono caratteristiche uniche del metodo, dettagli procedurali critici e misure di controllo della qualità. La conformità alle componenti essenziali del metodo di prova contribuirà a garantire che un metodo proposto simile o una sua variante poggi sui medesimi concetti del metodo di riferimento convalidato corrispondente (9). Le componenti essenziali del metodo di prova sono descritte nei punti da 16 a 21 del metodo di prova e le prove devono essere eseguite conformemente a:

- le condizioni generali (punto 16)
- le condizioni funzionali, che comprendono:
 - la vitalità (punto 17);
 - la funzione di barriera (punto 18);
 - la morfologia (punto 19);
 - la riproducibilità (punto 20);
 - il controllo della qualità (punto 21).

II) Elenco minimo di sostanze di riferimento

7. Le sostanze di riferimento sono impiegate per determinare se l'affidabilità e l'accuratezza di un metodo di prova simile proposto, o di una sua variante, di cui è stata dimostrata una somiglianza sufficiente, sotto il profilo strutturale e funzionale, al metodo di riferimento convalidato, o che rappresenta una modifica di minore entità di uno dei tre metodi convalidati, sono comparabili o migliori rispetto all'affidabilità e all'accuratezza del metodo di riferimento convalidato (2) (8) (16) (23). Le 20 sostanze di riferimento raccomandate elencate nella tabella 1 comprendono le sostanze che rappresentano diverse classi chimiche di interesse (ossia categorie chimiche basate su gruppi funzionali) e l'intervallo completo dei punteggi di irritazione di Draize (da non irritante a fortemente irritante). Le sostanze incluse nell'elenco comprendono 10 sostanze appartenenti alla categoria 2 del sistema GHS/CLP e 10 sostanze non classificate, di cui 3 appartengono alla categoria opzionale 3 del sistema GHS delle Nazioni Unite. Per questo metodo, la categoria opzionale 3 non corrisponde a nessuna categoria. Le sostanze elencate nella tabella 1 sono selezionate tra le sostanze chimiche usate nella fase di ottimizzazione che è seguita alla pre-convalida e nello studio di convalida del metodo di riferimento convalidato, per quanto concerne la funzionalità chimica e lo stato fisico (14) (18). Tali sostanze di riferimento rappresentano il numero minimo di sostanze da utilizzare per valutare l'accuratezza e l'affidabilità di un metodo di prova simile proposto o di una sua variante, ma non devono essere usate per sviluppare nuovi metodi. Nelle situazioni in cui una delle sostanze elencate non sia disponibile possono essere utilizzate altre sostanze per le quali esistano adeguati dati di riferimento in vivo, prevalentemente selezionate dalle sostanze usate nella fase di ottimizzazione successiva alla pre-convalida o allo studio di convalida del metodo di riferimento convalidato. Facoltativamente, è possibile aggiungere all'elenco minimo di sostanze di riferimento altre sostanze che rappresentano classi chimiche diverse e per le quali sono disponibili adeguati dati di riferimento in vivo al fine di valutare più approfonditamente l'accuratezza del metodo proposto.

(1) GU L 225 del 21.8.2001, pag. 1.

Tabella 1

Elenco minimo di sostanze di riferimento per la determinazione dei valori di accuratezza e affidabilità per metodi RHE simili o varianti di tali metodi per le prove di irritazione cutanea ⁽¹⁾

Sostanza	Numero CAS	Stato fisico	Punteggio in vivo	Cat. VRM in vitro	Categoria GHS/CLP in vivo
1-bromo-4-clorobutano	6940-78-9	Liquido	0	Cat. 2	Nessuna cat.
dietil ftalato	84-66-2	Liquido	0	Nessuna cat.	Nessuna cat.
acido 1-naftalenacetico	86-87-3	Solido	0	Nessuna cat.	Nessuna cat.
fenossiacetato di allile	7493-74-5	Liquido	0,3	Nessuna cat.	Nessuna cat.
isopropanolo	67-63-0	Liquido	0,3	Nessuna cat.	Nessuna cat.
4-metil-tio-benzaldeide	3446-89-7	Liquido	1	Cat. 2	Nessuna cat.
stearato di metile	112-61-8	Solido	1	Nessuna cat.	Nessuna cat.
butirrato di eptile	5870-93-9	Liquido	1,7	Nessuna cat.	Nessuna cat.
salicilato di esile	6259-76-3	Liquido	2	Nessuna cat.	Nessuna cat.
cinnamaldeide	104-55-2	Liquido	2	Cat. 2	Nessuna cat. (Cat. opzionale 3) ⁽³⁾
1-decanolo ⁽²⁾	112-30-1	Liquido	2,3	Cat. 2	Cat. 2
aldeide ciclamenica	103-95-7	Liquido	2,3	Cat. 2	Cat. 2
1-bromoesano	111-25-1	Liquido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
idrocloreuro di 2-clorometil-3,5-dimetil-4-metossipiridina	86604-75-3	Solido	2,7	Cat. 2	Cat. 2
disolfuro di di-n-propile ⁽²⁾	629-19-6	Liquido	3	Nessuna cat.	Cat. 2
idrossido di potassio (5 % acq.)	1310-58-3	Liquido	3	Cat. 2	Cat. 2
benzenethiolo, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metile	7340-90-1	Liquido	3,3	Cat. 2	Cat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	Solido	3,3	Cat. 2	Cat. 2
eptanale	111-71-7	Liquido	3,4	Cat. 2	Cat. 2
tetracloroetilene	127-18-4	Liquido	4	Cat. 2	Cat. 2

⁽¹⁾ La selezione delle sostanze si basa sui seguenti criteri: i) le sostanze 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 convalida; v) non sono associate ad un profilo estremamente tossico (ad esempio, cancerogeno o tossico per la riproduzione) e non comportano costi di smaltimento eccessivi.

⁽²⁾ Sostanze che sono irritanti nel coniglio ma per le quali esistono prove affidabili che non sono irritanti nell'uomo ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾ ⁽³³⁾.

⁽³⁾ Nell'ambito del GHS, non menzionata nel CLP dell'UE

III) Valori definiti di accuratezza e affidabilità

8. Al fine di stabilire l'affidabilità e la pertinenza dei metodi simili proposti o di loro varianti da trasferire tra laboratori, tutte le 20 sostanze di riferimento della tabella 1 devono essere testate in almeno tre laboratori. Tuttavia, se il metodo proposto deve essere usato soltanto in un laboratorio, per la convalida non sono richieste prove effettuate in più laboratori. È comunque fondamentale che tali studi di convalida siano valutati in maniera indipendente da organismi di validazione riconosciuti a livello internazionale, in conformità delle linee guida internazionali (9). In ogni laboratorio, tutte le 20 sostanze di riferimento devono essere testate in tre prove indipendenti eseguite con diversi lotti di tessuto e in momenti sufficientemente distanziati tra loro. Ogni prova deve consistere in un minimo di tre repliche di tessuto testate simultaneamente per ogni sostanza sperimentale, per ogni campione negativo e per ogni campione positivo.
9. Il calcolo dei valori di affidabilità e accuratezza del metodo proposto dev'essere effettuato considerando tutti i quattro criteri riportati di seguito, garantendo che i valori di affidabilità e pertinenza siano calcolati in maniera predefinita e coerente:
 1. soltanto i dati di prove ottenuti da sequenze complete possono essere usati per calcolare la variabilità inter- e intralaboratoriale e la capacità predittiva (accuratezza) del metodo.
 2. La classificazione finale di ogni sostanza di riferimento in ogni laboratorio partecipante dev'essere ottenuta utilizzando il valore medio relativo alla vitalità nelle diverse prove di una sequenza completa.
 3. Soltanto i dati ottenuti per sostanze per le quali sono state condotte sequenze di prova complete in tutti i laboratori partecipanti possono essere utilizzati per calcolare la variabilità interlaboratorio del metodo.
 4. Il calcolo dei valori di accuratezza dev'essere fatto sulla base delle previsioni individuali di laboratorio ottenute per le 20 sostanze di riferimento dai vari laboratori partecipanti.

In questo contesto, una **sequenza di prova** consiste in tre prove indipendenti condotte in un laboratorio per una sostanza sperimentale. Una **sequenza di prova completa** è una sequenza di prova condotta in un laboratorio per una sostanza sperimentale in cui tutte le prove siano valide. Ciò significa che un'eventuale prova non valida annulla la validità dell'intera sequenza di tre prove.

Riproducibilità intra-laboratorio

10. La valutazione della riproducibilità intra-laboratorio dovrebbe mostrare una concordanza delle classificazioni (categoria 2 e nessuna categoria del sistema GHS/CLP), ottenuta in prove diverse e indipendenti svolte sulle 20 sostanze di riferimento da uno stesso laboratorio, che deve essere pari o superiore (\geq) al 90 %.

Riproducibilità inter-laboratorio

11. La valutazione della riproducibilità inter-laboratorio non è essenziale se il metodo proposto deve essere utilizzato in un solo laboratorio. Per i metodi che devono essere trasferiti da un laboratorio all'altro, la concordanza delle classificazioni (categoria 2 e nessuna categoria del sistema GHS/CLP), ottenuta in prove diverse e indipendenti svolte sulle 20 sostanze di riferimento fra almeno tre laboratori, deve essere pari o superiore (\geq) all'80 %.

Capacità predittiva (accuratezza)

12. L'accuratezza (sensibilità, specificità e accuratezza generale) del metodo simile proposto o di una sua variante dovrebbe essere comparabile o migliore a quella del metodo di riferimento convalidato, tenendo conto delle informazioni aggiuntive relative alla pertinenza nella specie di interesse (tabella 2). La sensibilità dovrebbe essere pari o superiore (\geq) all'80 % (2) (8) (23). Tuttavia, un'ulteriore limitazione specifica si applica alla sensibilità del metodo in vitro proposto, nel senso che soltanto due sostanze in vivo della categoria 2, *1-decanolo* e *disolfuro di di-n-propile*, possono essere erroneamente considerate come non classificabili (senza categoria) da più di un laboratorio partecipante. La specificità dovrebbe essere pari o superiore (\geq) al 70 % (2) (8) (23). Non esistono ulteriori limitazioni per quanto riguarda la specificità del metodo in vitro proposto, ossia qualsiasi laboratorio partecipante può erroneamente classificare qualsiasi sostanza in vivo senza categoria purché la specificità finale del metodo di prova rientri nell'intervallo accettabile. L'accuratezza generale dovrebbe essere pari o superiore (\geq) al 75 % (2) (8) (23). Sebbene la sensibilità del metodo di riferimento convalidato calcolata per le 20 sostanze di riferimento elencate nella tabella 1 sia pari al 90 %, il valore minimo per la sensibilità richiesto per ogni metodo simile o una sua variante da considerare valido è fissato all'80 %, poiché sia *1-decanolo* (una sostanza borderline) sia *disolfuro di di-n-propile* (un falso negativo del metodo di riferimento convalidato) sono note per essere prive di potenziale irritante nell'uomo (31) (32) (33), pur essendo state identificate come irritanti nel test sul coniglio. Poiché i modelli RhE si basano su cellule di origine umana, essi possono considerare tali sostanze come non irritanti ("nessuna categoria" del sistema GHS/CLP).

Tabella 2

Valori predittivi richiesti per la sensibilità, la specificità e l'accuratezza generale per un qualsiasi metodo simile o sua variante da considerare validi

Sensibilità	Specificità	Accuratezza generale
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Criteri di accettazione dello studio

13. È possibile che una o più prove riguardanti una o più sostanze sperimentali non soddisfino i criteri di accettazione dello studio per le sostanze sperimentali e i controlli o non siano accettabili per altri motivi. Per integrare i dati mancanti, per ogni sostanza sperimentale è ammissibile un numero massimo di due prove aggiuntive ("prove ulteriori"). Più precisamente, poiché in caso di prove ulteriori anche i controlli positivi e i controlli negativi devono essere testati simultaneamente, per ogni sostanza sperimentale può essere effettuato un numero massimo di due prove aggiuntive.
14. È possibile che, anche dopo le ulteriori prove, non si riesca a ottenere per ogni sostanza di riferimento il numero minimo di tre prove valide richiesto per ogni sostanza sperimentale in ogni laboratorio partecipante, il che comporterebbe la presenza di una matrice di dati incompleta. In questi casi, per poter considerare gli insiemi di dati accettabili, devono essere soddisfatti tutti i seguenti tre criteri:
1. tutte le 20 sostanze di riferimento devono almeno avere una sequenza di prove completa.
 2. In ognuno di almeno tre laboratori partecipanti, almeno l'85 % delle sequenze di prova dev'essere completo (per 20 sostanze, ossia sono ammesse in un laboratorio 3 sequenze di prova non valide).
 3. Almeno il 90 % di tutte le sequenze di prova possibili di almeno tre laboratori dev'essere completo (per 20 sostanze testate in 3 laboratori, ossia sono ammesse in totale 6 sequenze di prova non valide).»

3) Sono aggiunti i seguenti capitoli:

«B.49. TEST DEL MICRONUCLEO IN VITRO CON CELLULE DI MAMMIFERO

INTRODUZIONE

1. Il test del micronucleo in vitro (MNvit) è un test di genotossicità effettuato per rilevare la presenza di micronuclei (MN) nel citoplasma delle cellule durante l'interfase. I micronuclei possono formarsi a partire da frammenti cromosomici acentrici (ossia privi di centromero) o da cromosomi interi che non sono in grado di migrare ai poli durante l'anafase (una fase della divisione cellulare). Il saggio rileva l'attività delle sostanze con proprietà clastogeniche e aneugeniche (sostanze e miscele) (1) (2) nelle cellule che hanno iniziato la divisione cellulare durante o dopo l'esposizione alla sostanza sperimentale. Il presente metodo di prova (TM) permette il ricorso a protocolli sperimentali con e senza citocalasina B (citoB), un inibitore della polimerizzazione dell'actina. L'aggiunta di citoB prima della mitosi oggetto dello studio consente l'individuazione e l'analisi selettiva della frequenza dei micronuclei nelle cellule che hanno completato una mitosi, perché tali cellule sono binucleate (3) (4). Il presente metodo di prova permette altresì di ricorrere a protocolli senza blocco della citocinesi, purché si possa dimostrare che la popolazione cellulare analizzata si sia già avviata alla mitosi.
2. Oltre al saggio MNvit per individuare le sostanze (sostanze e miscele) che inducono la formazione di micronuclei, anche il ricorso a un blocco della citocinesi, alla marcatura immunochimica dei cinetocori o all'ibridazione con sonde centromero- o telomero-specifiche [ibridazione fluorescente in situ (FISH)] può fornire informazioni sui meccanismi di danno cromosomico e formazione di micronuclei (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Le procedure di marcatura e ibridazione possono essere impiegate quando si osserva un incremento della formazione di micronuclei e lo sperimentatore desidera stabilire se tale aumento è la conseguenza di eventi clastogenici e/o aneugenic.
3. I micronuclei rappresentano danni che sono trasmessi alle cellule figlie, mentre le aberrazioni cromosomiche verificatesi nelle cellule in metafase potrebbero non essere trasmesse. Poiché nelle cellule in interfase è possibile valutare i micronuclei in maniera relativamente obiettiva, il personale del laboratorio deve soltanto stabilire se le cellule hanno avviato o meno la divisione cellulare e quante di esse contengono un micronucleo. Di conseguenza, i preparati possono essere valutati con relativa rapidità e l'analisi può essere automatizzata, il che permetterebbe di valutare migliaia anziché centinaia di cellule per trattamento, e quindi di accrescere la potenza del saggio. Infine, poiché i micronuclei possono formarsi anche da cromosomi ritardatari, c'è la possibilità di individuare agenti che inducono aneuploidia, che solitamente è difficile esaminare tramite i tradizionali test sulle aberrazioni cromosomiche (cfr. la linea guida OCSE Test Guideline 473, capitolo B.10 del presente allegato) (17). Tuttavia, il saggio MNvit non permette di distinguere le sostanze che inducono poliploidia da quelle che causano clastogenicità senza il ricorso a tecniche speciali come la FISH, descritta al punto 2.

4. Il saggio MNvit è un metodo in vitro che in genere utilizza cellule umane o animali (di roditori). Il saggio offre una base completa per studiare il potenziale di danno cromosomico in vitro, poiché permette di rilevare agenti sia aneugeni sia clastogeni.
5. Il saggio MNvit è robusto ed efficace per vari tipi cellulari, con o senza ricorso a citoB. Sono numerosi i dati a sostegno della validità del saggio MNvit con diverse linee cellulari di roditori (CHO, V79, CHL/IU e L5178Y) e di linfociti umani (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Tra questi si annoverano, in particolare, gli studi internazionali di convalida coordinati dalla Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) e le relazioni dell'International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Le informazioni disponibili sono anche state riesaminate nell'ambito di uno studio di convalida retrospettivo basato sul peso dell'evidenza condotto dal Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (ECVAM) della Commissione europea, mentre la validità scientifica del metodo di prova è stata riconosciuta dal comitato scientifico consultivo dell'ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). È stato descritto l'uso di cellule umane della linea linfoblastoide TK6 (35), di cellule HepG2 (36) (37) e di cellule embrionali primarie di criceto siriano (38), sebbene tali cellule non siano state utilizzate in studi di convalida.

DEFINIZIONI

6. Le definizioni usate figurano nell'allegato 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. I saggi in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che le cellule non siano metabolicamente competenti per quanto riguarda le sostanze in esame. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni in vivo. Si deve prestare inoltre attenzione al fine di evitare condizioni che porterebbero a risultati positivi artefatti, che non riflettono una mutagenicità intrinseca, e che possono avere origine da cambiamenti marcati di pH o di osmolalità, o da elevati livelli di citotossicità (39) (40) (41). Se, aggiungendo la sostanza sperimentale, si verifica un cambiamento di pH del mezzo, il pH deve essere aggiustato, preferibilmente tamponando la soluzione pronta per l'uso affinché tutti i volumi rimangano gli stessi per tutte le concentrazioni testate e per tutti i controlli.
8. Per esaminare l'induzione di micronuclei è fondamentale che sia avvenuta la mitosi sia nelle colture trattate che in quelle non trattate. Lo stadio più informativo per il conteggio dei micronuclei è quello che si riscontra nelle cellule che hanno completato una mitosi durante o dopo il trattamento con la sostanza sperimentale.

PRINCIPIO DEL METODO

9. Le colture di cellule umane o di mammifero sono esposte alla sostanza sperimentale con e senza una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che non si utilizzino cellule con un'adeguata capacità metabolizzante. Ogni test dovrà comprendere controlli con solventi/veicoli e controlli positivi trattati in parallelo.
10. Durante o dopo l'esposizione alla sostanza sperimentale, le cellule sono coltivate per un periodo sufficiente a consentire che il danno cromosomico o del fuso porti alla formazione di micronuclei nelle cellule in interfase. Per l'induzione di aneuploidia, la sostanza sperimentale dovrebbe solitamente essere presente durante la mitosi. Le cellule in interfase coltivate e colorate sono analizzate per rilevare la presenza di micronuclei. Idealmente, si dovrebbero contare micronuclei soltanto nelle cellule che hanno completato la mitosi durante l'esposizione alla sostanza sperimentale o nell'eventuale periodo successivo all'esposizione. Nelle colture trattate con un inibitore della citocinesi questo risultato si ottiene prendendo in considerazione soltanto le cellule binucleate. In assenza di un inibitore della citocinesi è importante dimostrare che le cellule analizzate hanno avviato la divisione cellulare durante o dopo l'esposizione alla sostanza sperimentale. Per tutti i protocolli è essenziale dimostrare che la proliferazione cellulare è avvenuta sia nelle colture trattate che nei controlli; inoltre, nelle colture in cui si è riscontrata la presenza di micronuclei (o in colture parallele) dev'essere valutata l'entità della citotossicità o della citostasi indotta dalla sostanza sperimentale.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

11. Possono essere usati linfociti del sangue periferico umano primario coltivato (5) (19) (42) (43) e una serie di linee cellulari di roditori quali CHO, V79, CHL/IU e L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). L'uso di altre linee cellulari e di altri tipi di cellule deve essere giustificato in base alla loro dimostrata prestazione nel saggio, così come descritta nella sezione sui criteri di accettabilità. Poiché la frequenza generale dei micronuclei influenzerà la sensibilità del saggio, si raccomanda di utilizzare tipi cellulari con una frequenza bassa e stabile di formazione di micronuclei.

12. I linfociti del sangue periferico umano devono essere prelevati da individui giovani (circa 18-35 anni di età), sani, non fumatori, che non siano stati esposti di recente a sostanze chimiche genotossiche o a radiazioni. Se si raccolgono cellule da più donatori, il numero dei donatori dev'essere indicato. La frequenza dei micronuclei aumenta con l'età e questa tendenza è più marcata nelle donne rispetto agli uomini (44); occorre tener conto di tali elementi nella selezione delle cellule dei donatori.

Terreni e condizioni di coltura

13. Per mantenere le colture devono essere garantiti terreni e condizioni di incubazione adeguati (recipienti per coltura, concentrazione di CO₂, temperatura e umidità). Si controlli periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari stabilizzate e nei ceppi; non si usino ceppi contaminati o che presentano modifiche del numero modale dei cromosomi. Dovrebbero essere note la durata normale del ciclo cellulare e le condizioni di coltura utilizzate nel laboratorio di prova. Se si ricorre al metodo dell'inibizione della citocinesi, la concentrazione dell'agente inibitore dev'essere ottimizzata per lo specifico tipo cellulare e deve essere dimostrata la sua capacità di produrre un buon numero di cellule binucleate per l'analisi.

Preparazione delle colture

14. Linee cellulari stabilizzate e ceppi: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale da impedire che le colture raggiungano la confluenza in monostrati, e che le colture in sospensione non raggiungano una densità eccessiva prima della raccolta, e incubate a 37 °C.
15. Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (ad esempio, eparina) o linfociti isolati sono posti in un terreno di coltura contenente un mitogeno (ad esempio, fitoemoagglutina, PHA) prima dell'esposizione alla sostanza sperimentale e a citoB.

Attivazione metabolica

16. 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 è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattori (S9) ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici, come Aroclor 1254 (45) (46) o una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (46) (47) (48) (49). Quest'ultima combinazione è conforme alla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (50) e al regolamento (CE) n. 850/2004 relativo agli inquinanti organici persistenti (66), e ha dimostrato di essere tanto efficace quanto Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (46) (47) (48) (49). La frazione S9 viene di solito usata a concentrazioni comprese tra 1 e 10 % (v/v) nel terreno di coltura. Le condizioni del sistema di attivazione metabolica dipendono dalla classe chimica della sostanza in esame. In alcuni casi può essere opportuno utilizzare varie concentrazioni della frazione post-mitocondriale.
17. Linee cellulari modificate mediante ingegneria genetica che esprimono enzimi attivatori specifici nell'uomo o nel roditore possono eliminare la necessità di ricorrere a un sistema di attivazione metabolica esogeno e possono essere usate nel saggio. In questi casi la scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata (ad esempio, in base all'importanza delle ossidasi a funzione mista nel metabolismo della sostanza in esame (51) e della loro capacità di reagire ai clastogeni e agli aneugeni noti (cfr. la sezione sui criteri di accettabilità). Si deve riconoscere che la sostanza sperimentale non può essere metabolizzata dall'ossidasi o dalle ossidasi a funzione mista espresse; in tal caso, i risultati negativi non indicherebbero che la sostanza sperimentale non causa la formazione di micronuclei.

Sostanza in esame/Preparazione

18. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione in adeguati solventi o veicoli e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura e/o diluite prima del trattamento. Le sostanze gassose o volatili devono essere testate modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in contenitori sigillati) (52) (53). Si usino preparati recenti della sostanza, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Condizioni di esperimento

Solventi/veicoli

19. Il solvente/veicolo non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame e deve essere compatibile con la sopravvivenza delle cellule e con l'azione di S9 alla concentrazione usata. L'uso di solventi/veicoli poco noti (ad esempio, acqua, terreno di coltura cellulare, dimetilsolfossido) è ammesso purché suffragato da dati che ne provino la compatibilità con la sostanza sperimentale e l'assenza di tossicità genetica. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/veicolo acquoso.

Uso di citoB come inibitore della citocinesi

20. Una delle considerazioni più importanti riguardo alla prestazione del saggio MNvit è garantire che le cellule contaminate abbiano completato la mitosi durante il trattamento o nell'eventuale periodo di incubazione successiva al trattamento. La citocalasina B è l'agente più diffusamente usato per bloccare la citocinesi, poiché inibisce l'aggregazione dell'actina e, di conseguenza, impedisce la separazione delle cellule figlie dopo la mitosi, portando alla formazione di cellule binucleate (5) (54) (55). Il conteggio dei micronuclei, pertanto, può essere limitato alle cellule che si sono avviate alla mitosi durante o dopo il trattamento. L'effetto della sostanza sperimentale sulla proliferazione cellulare può essere misurato simultaneamente. La citocalasina B deve essere usata come inibitore della citocinesi quando si impiegano linfociti umani, perché la durata del ciclo cellulare può variare tra le colture e tra donatori e perché non tutti i linfociti rispondono alla PHA. Nei test su linee cellulari sono stati utilizzati altri metodi per stabilire se le cellule sottoposte a conteggio si sono divise; tali metodi sono descritti di seguito (cfr. il punto 26).

21. Per ciascun tipo cellulare il laboratorio deve determinare la concentrazione adeguata di citocalasina B per ottenere la frequenza ottimale di cellule binucleate nelle colture di controllo con solvente/veicolo. La concentrazione adeguata di citocalasina B è solitamente compresa tra 3 e 6 µg/ml.

Misurazione della proliferazione cellulare e della citotossicità e scelta delle concentrazioni di esposizione

22. Nel determinare la concentrazione massima di sostanza da testare si devono evitare concentrazioni che hanno la capacità di produrre risposte positive artefatte tra cui le concentrazioni che causano eccessiva citotossicità, precipitazione nel terreno di coltura e variazioni marcate di pH o osmolalità (39) (40) (41).

23. La proliferazione cellulare deve essere misurata per garantire che le cellule trattate si sono avviate alla mitosi durante il saggio e che i trattamenti sono condotti ad adeguati livelli di citotossicità (cfr. il punto 29). La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nelle cellule che richiedono attivazione metabolica sulla base dell'aumento relativo delle conte cellulari (RICC) o del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) (cfr. l'appendice 2 per le formule), a meno che non si ricorra alla citocalasina B. In tal caso, la citotossicità può essere determinata sulla base dell'indice di replicazione (RI) (cfr. l'appendice 2 per la formula).

24. Il trattamento di colture con citoB e la misurazione delle frequenze relative di cellule mononucleate, binucleate e multinucleate nella coltura rappresentano un metodo accurato per la quantificazione dell'effetto sulla proliferazione cellulare e dell'attività citotossica o citostatica di un trattamento (5), e garantiscono che siano conteggiate soltanto le cellule che hanno iniziato la divisione durante o dopo il trattamento.

25. Negli studi con citoB, la citostasi/citotossicità può essere quantificata sulla scorta dell'indice che misura la cinetica della proliferazione cellulare (CBPI) (5) (26) (56) o può essere ottenuto dall'indice di replicazione di almeno 500 cellule per coltura (cfr. l'appendice 2 per le formule). Se per valutare la proliferazione è usata la citocalasina B, si deve determinare un CBPI o un indice di replicazione a partire da almeno 500 cellule per coltura. Queste misurazioni, tra le altre, possono essere utilizzate per stimare la citotossicità confrontando valori nelle colture trattate e nei controlli. La valutazione di altri marcatori di citotossicità (ad esempio, confluenza, numero di cellule, apoptosi, necrosi, conteggio in metafase) può fornire informazioni utili.

26. Negli studi condotti senza citoB occorre dimostrare che le cellule contaminate nella coltura hanno avviato il processo di divisione durante o in seguito al trattamento con la sostanza sperimentale, per evitare che si producano falsi negativi. Tra i metodi usati per assicurare che siano contaminate le cellule in fase di divisione vi sono l'incorporazione e il successivo rilevamento di bromodeossiuridina (BrdU) per individuare le cellule che si sono replicate (57), la formazione di cloni quando cellule da linee cellulari permanenti sono trattate e contaminate in situ su un vetrino per microscopio (indice di proliferazione, PI) (25) (26) (27) (28) o la misurazione del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o dell'aumento relativo della conta cellulare (RICC) o altri metodi dimostrati (16) (56) (58) (59) (cfr. l'appendice 2 per le formule). La valutazione di altri marcatori di citotossicità o citostasi (ad esempio, confluenza, numero di cellule, apoptosi, necrosi, conteggio in metafase) può fornire informazioni utili.

27. Si usino almeno tre concentrazioni analizzabili. A tal fine può essere necessario eseguire l'esperimento utilizzando un maggior numero di concentrazioni strettamente intervallate e analizzando la formazione di micronuclei nelle concentrazioni che forniscono un intervallo di citotossicità adeguato. Una strategia alternativa consiste nell'eseguire un test di citotossicità preliminare per ridurre l'intervallo di tossicità del test definitivo.

28. La concentrazione più elevata deve puntare a produrre una tossicità pari a $55 \pm 5\%$. Livelli più elevati possono indurre danni cromosomici come effetto secondario di citotossicità (60). In caso di sostanze citotossiche, le concentrazioni selezionate per il saggio devono andare dalla citotossicità $55 \pm 5\%$ ad una tossicità assente o modica.

29. Se non si osserva citotossicità o non si rileva la presenza di un precipitato, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 0,01 M, 5 mg/mL o 5 µl/mL (si scelga il valore più basso). Le concentrazioni scelte per l'analisi cioè devono essere di norma separate al massimo da un fattore compreso tra 0 e più di 10. Per sostanze che esibiscono una curva concentrazione-risposta a forte inclinazione potrebbe essere necessario intervallare più frequentemente le concentrazioni della sostanza, affinché si possano contare anche le colture che ricadono nell'intervallo di tossicità moderata o bassa.
30. Per sostanze difficilmente solubili, la dose massima, se non limitata dalla citotossicità, dovrebbe essere la concentrazione più bassa in cui sia visibile la precipitazione minima nelle colture, purché questa non interferisca con la valutazione. La valutazione della precipitazione dev'essere fatta sulla base di tecniche quali la microscopia ottica, rilevando il precipitato che persiste o appare durante la coltura (al termine del trattamento).

Controlli

31. Ogni test dovrà comprendere controlli positivi e con solvente o veicolo trattati in parallelo, con e senza attivazione metabolica.
32. I controlli positivi sono necessari per dimostrare la capacità delle cellule usate, e del protocollo sperimentale, di individuare clastogeni e aneugeni, e di affermare la capacità metabolica del preparato S9. Come controlli positivi si utilizzino induttori noti della formazione di micronuclei, a livelli ai quali ci si attende un aumento modesto ma riproducibile rispetto ai valori normali, che dimostri la sensibilità del test. La concentrazione del controllo positivo deve essere tale che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente al lettore l'identità dei vetrini codificati.
33. Per dimostrare sia la competenza metabolica sia la capacità del test di rilevare i clastogeni dev'essere usato un clastogeno che esige attivazione metabolica (ad esempio, ciclofosfamide; benzo[a]pirene). Si possono usare altre sostanze per i controlli positivi, se giustificate. Poiché in alcune condizioni sperimentali o in determinate linee cellulari taluni controlli positivi che richiedono l'attivazione metabolica possono essere attivi senza attivazione metabolica esogena, la necessità dell'attivazione metabolica, e dell'attività del preparato S9, dev'essere testata nella linea cellulare selezionata e alle concentrazioni selezionate.
34. Attualmente, non sono noti aneugeni che richiedono l'attivazione metabolica per la loro attività genotossica (16). I controlli positivi attualmente accettati per l'attività aneugenica sono, per esempio, colchicina e vinblastina. Possono essere usate altre sostanze chimiche, se inducono la formazione di micronuclei esclusivamente o prevalentemente mediante attività aneugenica. Per evitare la necessità di due controlli positivi (per clastogenicità e aneugenicità) senza attivazione metabolica, il controllo per l'aneugenicità può essere utilizzato come controllo positivo senza S9, e il controllo per la clastogenicità può essere impiegato per valutare l'adeguatezza del sistema di attivazione metabolica usato. Nelle cellule che non necessitano di S9 possono essere usati controlli positivi sia per la clastogenicità che per l'aneugenicità. I controlli positivi raccomandati figurano nell'appendice 3.
35. Si può prendere in considerazione l'uso di sostanze di una classe chimica correlata, se sono disponibili sostanze adeguate. Tutti i controlli positivi utilizzati devono essere adeguati per il tipo cellulare e per le condizioni di attivazione.
36. Per ogni fase di raccolta si effettuino anche controlli con solvente o veicolo. Si proceda inoltre a controlli negativi non trattati (senza solvente/veicolo), salvo che dati precedenti pubblicati o di laboratorio provino che il solvente scelto non induce effetti genotossici o altri effetti nocivi alle concentrazioni utilizzate.

PROCEDURA

Calendario del trattamento

37. Per massimizzare la probabilità di individuare un aneugeno o un clastogeno in azione in un determinato stadio del ciclo cellulare è importante che quantitativi sufficienti di cellule siano trattati con la sostanza sperimentale in tutte le fasi dei cicli cellulari. Il calendario di trattamento per le linee cellulari e per le colture cellulari primarie, pertanto, può differire in parte da quello previsto per i linfociti, che per avviare il ciclo cellulare necessitano di una stimolazione mitogenica (cfr. i punti 41-43) (16).
38. Considerazioni teoriche, unitamente ai dati pubblicati, (18) indicano che la maggior parte degli aneugeni e dei clastogeni sarà rilevata entro un periodo di trattamento breve di 3 fino a 6 ore, con o senza S9, cui seguirà la rimozione della sostanza sperimentale e un periodo di crescita di 1,5-2,0 cicli cellulari (6). Le cellule sono campionate in un lasso di tempo pari a circa 1,5-2,0 volte la durata normale (ossia senza trattamento) del ciclo cellulare, dopo l'inizio o alla fine del trattamento stesso (cfr. la tabella 1). I tempi di campionamento o di recupero possono essere estesi se è noto o si sospetta che la sostanza sperimentale incide sulla durata del ciclo cellulare (ad esempio, se si sperimentano analoghi nucleosidici).

39. In considerazione della potenziale tossicità dei preparati S9 per le cellule di mammifero coltivate, l'esposizione al trattamento è estesa di 1,5–2,0 cicli cellulari normali soltanto in assenza di S9. In caso di estensione il trattamento con la sostanza sperimentale può essere effettuato con o senza citoB. Queste alternative permettono di gestire situazioni in cui vi siano timori per le potenziali interazioni tra la sostanza sperimentale e citoB.
40. I calendari di trattamento suggeriti figurano nella tabella 1. Si tratta di calendari generici che possono essere modificati in base alla stabilità o alla reattività della sostanza sperimentale ovvero alle particolari caratteristiche di crescita delle cellule utilizzate. Tutti i trattamenti devono iniziare e terminare nel momento di crescita esponenziale delle cellule. I calendari sono illustrati in maniera più dettagliata ai punti 41-47.

Tabella 1

Trattamento delle cellule e fasi di raccolta per il saggio MNvit

Linfociti, cellule primarie e linee cellulari trattate con citoB	+ S9	Trattare per 3-6 ore con S9; rimuovere S9 e terreno di coltura; aggiungere nuovo terreno e citoB; procedere alla raccolta a distanza di 1,5–2,0 cicli cellulari normali.
	– S9 Breve esposizione	Trattare per 3-6 ore; rimuovere il terreno di coltura; aggiungere nuovo terreno e citoB; procedere alla raccolta a distanza di 1,5–2,0 cicli cellulari normali.
	– S9 Esposizione Prolungata	Opzione A: trattare per 1,5–2 cicli cellulari normali con citoB; procedere alla raccolta al termine del periodo di esposizione. Opzione B: trattare per 1,5–2,0 cicli cellulari normali; asportare la sostanza sperimentale; aggiungere nuovo terreno e citoB; procedere alla raccolta dopo 1,5–2,0 cicli cellulari normali.

Linee cellulari trattate senza citoB
(medesimo calendario di trattamento descritto sopra, a eccezione dell'aggiunta di citoB)

Linfociti, cellule primarie e linee cellulari con citoB

41. Per i linfociti, l'approccio più efficiente è iniziare l'esposizione alla sostanza sperimentale a distanza di 44-48 ore dopo la stimolazione con PHA, quando la sincronizzazione del ciclo sarà scomparsa (5). Nel saggio iniziale, le cellule sono trattate per 3 fino a 6 ore con la sostanza sperimentale, con o senza S9. Il terreno di coltura viene rimosso e sostituito con nuovo terreno contenente citoB; si procede alla raccolta quando è trascorso un periodo equivalente a 1,5–2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.
42. Se entrambi i test iniziali del trattamento breve (3-6 ore) sono negativi o ambigui, si ricorre a un'ulteriore esposizione successiva con S9. In tal caso sono possibili due opzioni, entrambe accettabili. Tuttavia, potrebbe essere più appropriato seguire l'opzione A per i linfociti stimolati se la crescita esponenziale risulta in calo a distanza di 96 ore dalla stimolazione. Inoltre, nell'opzione B le colture cellulari non devono aver raggiunto la confluenza prima dell'ultimo campionamento.
- Opzione A: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5–2,0 cicli cellulari normali; si procede alla raccolta al termine del periodo di trattamento.
 - Opzione B: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5–2,0 cicli cellulari normali. Il terreno di coltura è rimosso e sostituito con nuovo terreno; si procede alla raccolta quando è trascorso un ulteriore periodo equivalente a 1,5–2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.
43. Le cellule primarie e le linee cellulari devono essere trattate in maniera analoga ai linfociti, salvo che non è necessario ricorrere alla stimolazione con PHA per 44-48 ore. Le cellule diverse dai linfociti devono essere esposte in maniera tale che, al momento della conclusione dello studio, le cellule si trovino ancora in una fase di crescita esponenziale.

Linee cellulari senza citoB

44. Le cellule sono trattate per 3-6 ore, in presenza o in assenza di S9. Il terreno di coltura è rimosso e sostituito con nuovo terreno; si procede alla raccolta quando è trascorso un periodo equivalente a 1,5-2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.
45. Se entrambi i test iniziali del trattamento breve (3-6 ore) sono negativi o ambigui, si ricorre a un'ulteriore esposizione successiva con (senza S9). In tal caso sono possibili due opzioni, entrambe accettabili:
- Opzione A: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5-2,0 cicli cellulari normali; si procede alla raccolta al termine del periodo di trattamento.
 - Opzione B: le cellule sono trattate con la sostanza sperimentale per 1,5-2,0 cicli cellulari normali. Il terreno di coltura è rimosso e sostituito con nuovo terreno; si procede alla raccolta quando è trascorso un ulteriore periodo equivalente a 1,5-2,0 volte la durata del ciclo cellulare normale.
46. Nei monostrati possono essere presenti cellule mitotiche (identificabili perché di forma tonda e in fase di distacco dalla superficie) al termine del trattamento di 3-6 ore. Poiché tali cellule mitotiche si staccano facilmente, potrebbero andare perdute al momento della rimozione del terreno di coltura. Tali cellule vanno raccolte con una certa attenzione quando le colture vengono lavate e vanno riposte nuovamente nelle colture per evitare di perdere cellule in mitosi, e quindi a rischio di formazione di micronuclei, al momento della raccolta.

Numero di colture

47. Per ogni concentrazione di sostanza sperimentale e per le colture dei controlli negativi e con solvente/veicolo si utilizzino colture doppie. Se è possibile dimostrare, a partire da dati di laboratorio pregressi, una variazione minima tra colture doppie, si potrebbe ricorrere a colture singole. In tal caso, si raccomanda di analizzare un maggior numero di concentrazioni.

Raccolta delle colture e preparazione dei vetrini

48. Per ogni coltura si procede a una raccolta e a un'elaborazione separate. Per la preparazione delle cellule può essere necessario un trattamento ipotonico, che tuttavia si può evitare se, con altri mezzi, è possibile ottenere un'adeguata diffusione delle cellule. Possono essere usate tecniche diverse per la preparazione dei vetrini, purché siano garantiti preparati cellulari di elevata qualità per il conteggio. Il citoplasma cellulare può essere conservato per consentire il rilevamento dei micronuclei e (con il metodo di inibizione della citocinesi) l'individuazione affidabile di cellule binucleate.
49. I vetrini possono essere colorati con tecniche diverse, per esempio con il metodo Giemsa o tinte fluorescenti che si legano al DNA (59). L'uso di un colorante specifico per il DNA [ad esempio, arancio di acridina (61) o Hoechst 33258 più pironina-Y (62)] può eliminare alcuni degli artefatti dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Per individuare i contenuti (cromosoma/frammento cromosomico) dei micronuclei possono essere usati anche anticorpi anticinetocore, FISH con sonde di DNA pancentromerico o marcatura in situ mediante primer specifici per DNA pancentromerico, unitamente a un'adeguata colorazione del DNA, se interessa acquisire informazioni sui meccanismi di formazione dei micronuclei (15)(16). Possono infine essere usati altri metodi per distinguere i clastogeni dagli aneugeni, purché sia stata dimostrata la loro efficacia.

Analisi

50. Tutti i vetrini, compresi quelli del solvente/veicolo e dei controlli, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio. In alternativa, i campioni codificati possono essere esaminati mediante un sistema convalidato e automatizzato di analisi citometrica o di analisi per immagini.
51. Nelle colture trattate con citoB, le frequenze dei micronuclei devono essere analizzate in almeno 2 000 cellule binucleate per concentrazione (almeno 1 000 cellule binucleate per coltura; due colture per concentrazione). Se si utilizza un'unica coltura, dalla stessa devono essere contate almeno 2 000 cellule binucleate per concentrazione. Se per il conteggio è disponibile un numero sostanzialmente inferiore a 1 000 cellule binucleate per coltura, o a 2 000 cellule se si usa un'unica coltura, per ogni concentrazione, e se non si rileva un aumento significativo dei micronuclei, il saggio dev'essere ripetuto con più cellule o con una concentrazione meno tossica, a seconda di quale opzione sia più appropriata. Si deve prestare attenzione a non conteggiare cellule binucleate con forme irregolari o che evidenzino due nuclei di dimensioni marcatamente diverse; le cellule binucleate non possono inoltre essere confuse con cellule multinucleate a scarsa diffusione. Le cellule contenenti più di due nuclei principali non devono essere considerate per la ricerca di micronuclei, poiché la frequenza di riferimento dei micronuclei può essere superiore in queste cellule (63) (64). Il calcolo delle cellule mononucleate è accettabile se è dimostrato che la sostanza sperimentale interferisce con l'attività della citoB.

52. Nelle linee cellulari testate senza trattamento con citoB, i micronuclei devono essere contati in almeno 2 000 cellule per concentrazione (almeno 1 000 cellule per coltura; due colture per concentrazione). Se si utilizza soltanto una coltura per concentrazione, da tale coltura devono essere contate almeno 2 000 cellule.
53. Nei trattamenti con citoB dev'essere determinato un CBPI o un RI per valutare la proliferazione cellulare (cfr. l'appendice 2) a partire da almeno 500 cellule per coltura. Al contrario, nei trattamenti effettuati senza citoB, è fondamentale dimostrare che le cellule inserite nel conteggio sono in fase di proliferazione, come si è detto ai punti 24-27.

Criteri di accettabilità

54. Un laboratorio che propone di utilizzare il saggio MNvit descritto nel presente metodo di prova deve dimostrare la propria capacità di individuare con affidabilità e accuratezza le sostanze chimiche con un'attività aneugenica e clastogenica nota, con e senza attivazione metabolica, oltre che le sostanze chimiche negative note, con l'impiego delle sostanze di riferimento riportate nell'appendice 3. Come prova della sua capacità di eseguire il presente metodo di prova correttamente, il laboratorio deve dimostrare che le cellule conteggiate per la formazione di micronuclei hanno portato a termine una divisione nucleare se il test è condotto senza l'impiego di citoB.
55. Si raccomanda di utilizzare le sostanze elencate nell'appendice 3 come sostanze di riferimento. Possono essere incluse sostanze alternative o aggiuntive, purché la loro attività sia nota e inducano la formazione di micronuclei mediante gli stessi meccanismi d'azione, e qualora si dimostri che tali sostanze sono rilevanti per le sostanze chimiche che saranno testate con la procedura MNvit. Tra le motivazioni addotte può figurare uno studio di convalida che utilizza un'ampia varietà di sostanze o incentrato su uno spettro più ridotto in base alla classe chimica della sostanza sperimentale o al meccanismo che produce il danno.
56. Dal controllo con solvente/veicolo e dalle colture non trattate devono emergere frequenze di formazione di micronuclei basse e coerenti in maniera riproducibile (normalmente 5-25 micronuclei/1 000 cellule per i tipi cellulari individuati al punto 11). Altri tipi cellulari possono avere gamme di risposta diverse, che devono essere determinate al momento della convalida ai fini di un loro impiego nel saggio MNvit. I dati provenienti dai controlli negativi, positivi e con solvente devono essere utilizzati per fissare range di controllo storici. Tali valori vanno considerati per decidere in merito all'adeguatezza dei controlli positivi e negativi paralleli per un esperimento.
57. Se si propongono per il saggio modifiche di modesta entità al protocollo (ad esempio, uso di tecniche di conteggio automatizzate anziché manuali, uso di un nuovo tipo cellulare), l'efficacia di tali modifiche dev'essere dimostrata prima di considerare adatto all'uso il protocollo modificato. Per dimostrare l'efficacia è necessario dimostrare che i principali meccanismi di rottura cromosomica e di perdita o acquisizione di materiale cromosomico possono essere rilevati e che è possibile ottenere risultati positivi e negativi appropriati per la classe della sostanza in esame, o per la più ampia gamma di sostanze in esame.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

58. Se si ricorre alla tecnica dell'inibizione della citocinesi, per valutare l'induzione di micronuclei si usano soltanto le frequenze di cellule binucleate con micronuclei (indipendentemente dal numero di micronuclei per cellula). Il conteggio del numero di cellule con uno, due o più micronuclei non è obbligatorio, anche se potrebbe fornire informazioni utili.
59. Per tutte le colture di controllo trattate e per quelle con solvente/veicolo si determini in parallelo la citotossicità e/o la citostasi (58). Nell'eventualità in cui si ricorra al metodo dell'inibizione della citocinesi, per tutte le colture trattate e per i controlli dev'essere calcolato il CBPI o l'RI quale misurazione del ritardo del ciclo cellulare. Nei trattamenti senza citoB si utilizza l'RPD o il RICC o il PI (cfr. l'appendice 2).
60. Devono essere forniti dati sulle singole colture. Tutti i dati devono essere riportati sinteticamente in una tabella.
61. Le sostanze chimiche che inducono formazione di micronuclei nel saggio MNvit possono avere questo effetto come conseguenza dell'induzione della rottura cromosomica, della perdita di cromosomi o di entrambi tali eventi. Si può ricorrere a un'ulteriore analisi con anticorpi anticinetocore, sonde centromero-specifiche in situ o altri metodi per stabilire se il meccanismo di induzione di micronuclei è dovuto a un'attività clastogenica e/o aneugenica.

Valutazione e interpretazione dei risultati

62. Non è richiesta la verifica di una risposta chiaramente positiva o negativa mediante test ulteriori. I risultati ambigui possono essere chiariti attraverso l'analisi di altre 1 000 cellule prelevate da tutte le colture per evitare la perdita di cecità. Se questo approccio non risolve l'ambiguità, occorre ricorrere a test ulteriori. Negli esperimenti di follow-up è bene considerare l'opportunità di variare i parametri dello studio in base a una serie ampliata o limitata di condizioni, a seconda dei casi. Tra i parametri che potrebbero essere modificati si annoverano l'intervallazione delle concentrazioni sperimentali, la durata del trattamento e la raccolta delle cellule, e/o le condizioni di attivazione metabolica.

63. Vari criteri permettono di determinare se un risultato è positivo, ad esempio un aumento correlato alla concentrazione o un aumento statisticamente significativo del numero di cellule che presentano micronuclei. Si consideri per prima cosa la rilevanza dei risultati dal punto di vista biologico. Il fatto di stabilire se i valori osservati rientrano o trascendono l'intervallo storico dei controlli può fornire informazioni importanti per la valutazione della significatività biologica della risposta. Si possono usare metodi statistici adeguati come ausilio nella valutazione dei risultati sperimentali (65), ma i risultati delle prove statistiche dovrebbero essere analizzati alla luce del rapporto dose-risposta. Si deve infine tener conto della riproducibilità e dei dati storici.
64. La maggior parte degli esperimenti fornirà risultati chiaramente positivi o negativi, ma occasionalmente i dati ottenuti non consentiranno di formulare un giudizio definitivo sull'azione della sostanza in esame. I risultati possono rimanere ambigui o dubbi nonostante l'esperimento venga ripetuto più volte.
65. Risultati positivi del saggio MNvit indicano che una sostanza induce rottura cromosomica o perdita di materiale cromosomico nelle cellule germinali della specie sottoposta a test. Risultati negativi indicano che, nelle condizioni del test, la sostanza in esame non induce rotture cromosomiche e/o acquisizione o perdita di materiale cromosomico nelle cellule germinali della specie sottoposta a test.

Relazione sul saggio

66. La relazione sul saggio deve contenere perlomeno le seguenti informazioni, se pertinenti per l'esecuzione dello studio:

Sostanza chimica di prova

- dati di identificazione e numeri CAS e CE;
- caratteristiche fisiche e purezza;
- proprietà fisico-chimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio;
- reattività della sostanza sperimentale al solvente/veicolo o al terreno di coltura cellulare;

Solvente/veicolo

- motivazione della scelta del solvente/veicolo;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/veicolo;

Cellule

- tipo e origine delle cellule usate;
- adeguatezza del tipo cellulare usato;
- assenza di micoplasmi, se del caso;
- informazioni sulla durata del ciclo cellulare, sui tempi di raddoppiamento o sull'indice di proliferazione;
- se si utilizzano linfociti, sesso, età e numero dei donatori di sangue, se del caso;
- se si utilizzano linfociti, precisazione in merito all'esposizione di sangue intero o di singoli linfociti;
- numero di passaggi in coltura, se del caso;
- metodi usati per la conservazione delle colture cellulari, se del caso;
- numero modale di cromosomi;
- durata del normale ciclo cellulare (controlli negativi);

Condizioni di prova

- identità dell'inibitore della citocinesi (ad esempio, citoB), se impiegato, e la sua concentrazione oltre che la durata di esposizione delle cellule;
- criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture, compresi i dati sulla citotossicità e sui limiti di solubilità, se disponibili;

- composizione del terreno di coltura, concentrazione di CO₂, se del caso;
- concentrazioni della sostanza in esame;
- concentrazione (e/o volume) del veicolo e della sostanza di prova aggiunti;
- temperatura e tempo di incubazione;
- durata del trattamento;
- momento della raccolta dopo il trattamento;
- densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso;
- tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica, compresi i criteri di accettabilità;
- controlli positivi e negativi;
- metodi di preparazione dei vetrini e tecniche di colorazione utilizzati;
- criteri di identificazione dei micronuclei;
- numeri di cellule analizzate;
- metodi di misura della citotossicità;
- eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità;
- criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;
- metodo o metodi di analisi statistica usati;
- metodi, come l'uso di anticorpi anticinetocore, per stabilire se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso;

Risultati

- metodo di misurazione della citotossicità impiegato, ad esempio CBPI o RI, se si ricorre al metodo dell'inibizione della citocinesi; RICC, RPD o PI, se non si ricorre a metodi di inibizione della citocinesi; altre osservazioni, se del caso, ad esempio confluenza cellulare, apoptosi, necrosi, conta in metafase, frequenza di cellule binucleate;
- segni di precipitazione;
- dati sul pH e sull'osmolalità del terreno di trattamento, se determinati;
- definizione delle cellule accettabili per l'analisi;
- distribuzione delle cellule mononucleate, binucleate e multinucleate, se si utilizza un metodo di inibizione della citocinesi;
- numero di cellule con micronuclei, indicato separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo, e indicazione relativa alla loro origine (se da cellule binucleate o mononucleate), se del caso;
- relazione concentrazione-risposta, se possibile;
- dati sui controlli negativi (solvente/veicolo) e positivi (concentrazioni e solventi) paralleli;
- precedenti dati sui controlli negativi (solvente/veicolo) e positivi, con variazioni, medie e deviazioni standard e con l'indicazione dell'intervallo di confidenza (ad esempio, 95 %);
- analisi statistica; valori p, se noti;

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

Appendice 1

Definizioni

Aneugeno: qualsiasi sostanza 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).

Apoptosi: morte cellulare programmata caratterizzata da una serie di fasi che portano alla disintegrazione delle cellule in particelle legate alla membrana, le quali vengono poi eliminate mediante fagocitosi o "shedding" (clivaggio dei ricettori di membrana).

Proliferaazione cellulare: aumento del numero di cellule dovuto alla divisione mitotica delle cellule.

Centromero: regione del DNA di un cromosoma in cui la coppia dei cromatidi è mantenuta unita e sulla quale sono localizzati fianco a fianco i due cinetocori.

Clastogeno: qualsiasi sostanza o processo in grado di provocare aberrazioni nella struttura di un cromosoma in popolazioni di cellule o organismi.

Citocinesi o citodieresi: il processo di divisione cellulare immediatamente successivo alla mitosi e che porta alla formazione di due cellule figlie, ciascuna contenente un nucleo.

Indice di proliferazione cellulare (CBPI): la proporzione di cellule in fase di seconda divisione nella popolazione trattata rispetto al controllo (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Citostasi: inibizione della crescita cellulare (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Citotossicità: effetti dannosi a carico della struttura o della funzione cellulare che in ultima istanza provocano la morte della cellula.

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

Cellule in interfase: cellule non ancora approdate alla fase mitotica.

Cinetocore: una struttura proteica che si forma nel centromero di un cromosoma e alla quale si agganciano i microtubuli del fuso durante la divisione cellulare, consentendo un movimento ordinato dei cromosomi delle cellule figlie verso i poli di queste ultime.

Micronuclei: piccoli nuclei, distinti e soprannumerari rispetto al principale nucleo delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi o della meiosi da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

Mitosi: divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, prometafase, metafase, anafase e telofase.

Indice mitotico: il rapporto tra cellule in metafase e il numero totale di cellule osservate in una popolazione cellulare; un'indicazione del grado di proliferazione cellulare di una popolazione.

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 cromosomica).

Non disgiunzione: incapacità della coppia di cromatidi di separarsi e di migrare in due cellule figlie distinte in fase di divisione, con la conseguenza che una cellula figlia presenterà un numero anomalo di cromosomi.

Poliploidia: aberrazioni numeriche dei cromosomi che interessa l'intero corredo cromosomico di cellule o organismi, a differenza dall'aneuploidia, che invece interessa un solo cromosoma o più cromosomi, ma non l'intero corredo cromosomico.

Indice di proliferazione (PI): metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Aumento relativo della conta cellulare (Relative Increase in Cell Count, RICC): metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Raddoppiamento relativo della popolazione (Relative Population Doubling, RPD): metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Indice di replicazione (RI): la proporzione dei cicli di divisione cellulare completati in una coltura trattata rispetto al controllo, durante il periodo di esposizione e il recupero (cfr. l'appendice 2 per la formula).

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Formule per la valutazione della citotossicità

1. Nei trattamenti con citoB, la valutazione della tossicità deve basarsi sull'indice di proliferazione cellulare (CBPI) o sull'indice di replicazione (RI) (16) (58). Il CBPI indica la media dei cicli cellulari per singola cellula durante il periodo di esposizione alla citoB e può essere usato per calcolare la proliferazione cellulare. L'RI indica il numero relativo di nuclei nelle colture trattate rispetto ai controlli e può essere usato per calcolare la % di citostasi:

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

e:

T = coltura di trattamento con la sostanza chimica

C = coltura di controllo con veicolo

dove:

$$CBPI = \frac{((n. \text{ cellule mononucleate}) + (2 \times n. \text{ cellule binucleate}) + (3 \times n. \text{ cellule multinucleate}))}{(\text{Numero totale di cellule})}$$

Quindi, un CBPI pari a 1 (tutte le cellule sono mononucleate) equivale a una percentuale di citostasi del 100 %.

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

$$RI = \frac{((n. \text{ cellule binucleate}) + (2 \times n. \text{ cellule multinucleate})) \div (\text{Numero totale di cellule})_T}{((n. \text{ cellule binucleate}) + (2 \times n. \text{ cellule multinucleate})) \div (\text{Numero totale di cellule})_C} \times 100$$

T = colture trattate

C = colture di controllo

2. Quindi, un RI del 53 % significa che, rispetto al numero di cellule che si sono divise per formare cellule binucleate e multinucleate nella coltura di controllo, nella coltura trattata soltanto il 53 % si è avviato alla divisione, ossia si ha una percentuali di citostasi pari al 47 %.

3. Nei trattamenti senza citoB, si raccomanda di valutare la citotossicità in base all'aumento relativo delle conte cellulari (RICC) o al raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) (58), poiché entrambi i metodi tengono conto della proporzione di popolazione cellulare che è andata incontro a divisione.

$$RICC = \frac{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture trattate (definitivo - iniziale)})}{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture di controllo (definitivo - iniziale)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{n. di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})}{(\text{n. di raddoppiamenti della popolazione nelle colture di controllo})} \times 100$$

dove:

Raddoppiamento della popolazione = [logaritmo (numero di cellule dopo il trattamento ÷ numero di cellule iniziale)] ÷ logaritmo 2

4. Quindi, un RICC o un RPD del 53 % indica una citotossicità/citostasi del 47 %.

5. Con un indice di proliferazione (PI) è possibile valutare la citotossicità contando il numero di cloni consistenti in 1 cellula (c1), 2 cellule (c2), da 3 a 4 cellule (c4) e da 5 a 8 cellule (c8)

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

6. Il PI è stato usato come parametro di citotossicità valido e affidabile anche per le linee cellulari coltivate in situ in assenza di citoB (25) (26) (27) (28).

Appendice 3

Sostanze di riferimento raccomandate per la valutazione della prestazione ⁽¹⁾

Categoria	Sostanza	CAS	CE
1. Clastogeni attivi senza attivazione metabolica			
	Citosina arabinoside	147-94-4	205-705-9
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogeni che richiedono attivazione metabolica			
	Benzo(a)pirene	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamide	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeni			
	Colchicina	64-86-8	200-598-5
	Vinblastina	143-67-9	205-606-0
4. Sostanze negative			
	Di-2-etiltilftalato	117-81-7	204-211-0
	Acido nalidixico	389-08-2	206-864-7
	Pirene	129-00-0	204-927-3
	Cloruro di sodio	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Le sostanze di riferimento sono le sostanze di cui si raccomanda l'uso. Nell'elenco possono essere incluse sostanze alternative o aggiuntive, purché la loro attività sia nota e inducano la formazione di micronuclei mediante gli stessi meccanismi d'azione, e qualora si dimostri che tali sostanze sono rilevanti per le sostanze chimiche che saranno testate con la procedura MNvit. A seconda dello scopo, tra le motivazioni addotte può figurare anche uno studio di convalida che utilizza un'ampia varietà di sostanze o incentrato su uno spettro più ridotto in base alla classe chimica della sostanza sperimentale o al meccanismo che produce il danno.

B.50. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: DA

INTRODUZIONE

- Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (OCSE Guidelines for the Testing of Chemicals) e i metodi di prova dell'UE vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. Il primo metodo di prova (TM) (B.42) per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, denominato Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429), è stato rivisto (1). Sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla validazione dell'LLNA nonché una revisione delle attività a queste associate (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Nell'LLNA si utilizzano timidina o iodina marcate con traccianti radioisotopici per misurare la proliferazione dei linfociti; di conseguenza, quando l'acquisizione, l'impiego o lo smaltimento della radioattività risultano problematici, il ricorso al saggio è limitato. L'LLNA: DA (sviluppato da Daicel Chemical Industries, Ltd.) è una variante non radioattiva del metodo LLNA, che quantifica il contenuto di adenosina trifosfato (ATP) tramite bio-luminescenza utilizzandolo come indicatore della proliferazione linfocitaria. Il saggio LLNA: DA è stato convalidato, rivisto e raccomandato da un gruppo internazionale di esperti scientifici indipendenti, che lo considerano utile per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano o non provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti (10) (11) (12) (13). Il presente metodo di prova è stato concepito per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. Il capitolo B.6 del presente allegato e la linea guida dell'OCSE "Test Guideline 406" utilizzano saggi sui porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (14). L'LLNA (capitolo B.42 del presente allegato; OCSE Test Guideline 429) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: DA (capitolo B.50 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 A) e LLNA: BrdU-ELISA (capitolo B.51 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 B), offrono tutti un vantaggio rispetto ai saggi sui porcellini d'India in B.6 e OCSE Test Guideline 406 (14) in termini di riduzione e perfezionamento dell'utilizzo di animali.
- Simile all'LLNA, l'LLNA: DA studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per una valutazione dose-risposta. Inoltre, la capacità del saggio di individuare sensibilizzanti cutanei senza la necessità di ricorrere a marcatori radioattivi per il DNA elimina il potenziale di esposizione professionale alla radioattività e le problematiche correlate allo smaltimento dei rifiuti. Ciò a sua volta può giustificare un accresciuto impiego dei topi per l'individuazione dei sensibilizzanti cutanei, che potrebbe ridurre ulteriormente l'uso dei porcellini d'India per testare il potenziale di sensibilizzazione cutanea (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14).

DEFINIZIONI

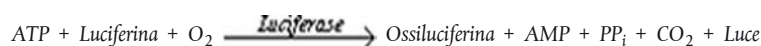
- Le definizioni usate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Il saggio LLNA: DA è una variante del metodo LLNA da usarsi per identificare le potenziali sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti specifici. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA: DA vada usato in tutti i casi in sostituzione del metodo LLNA o dei test sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma (10) (11). Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza del saggio LLNA: DA per la sostanza in questione [data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche LLNA: DA (cfr. il punto 5)] e servono a scegliere la dose.
5. L'LLNA: DA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività allergizzante da contatto. Essa ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo rispetto ai saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14). Inoltre, l'LLNA: DA rappresenta un significativo miglioramento (minor sofferenza e dolore fisico) del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sull'allergia da contatto perché, diversamente dal metodo B.6 e dalla linea guida OCSE Test Guideline 406, l'LLNA: DA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Nonostante i vantaggi dell'LLNA: DA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (14), occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 [ad esempio, i test con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei (tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi) (6) (1 e capitolo B.42 del presente allegato), la solubilità della sostanza di prova]. Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (16) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14). Si raccomanda di applicare anche all'LLNA: DA (10) i limiti che sono stati individuati per l'LLNA (1, e capitolo B.42 del presente allegato). Inoltre, l'uso del metodo LLNA: DA potrebbe non essere appropriato per la sperimentazione di sostanze che interferiscono con i livelli di ATP (ad esempio, sostanze che funzionano come inibitori degli ATP) o che non permettono un'accurata misurazione degli ATP intracellulari (ad esempio, presenza di enzimi che degradano gli ATP, presenza di ATP extracellulari nel linfonodo). A parte tali limiti già rilevati, l'LLNA: DA dovrebbe essere adatto per la sperimentazione di qualsiasi sostanza chimica, a meno che tale sostanza non possieda delle proprietà che possono interferire con l'accuratezza del saggio. Inoltre, non andrebbe esclusa la possibilità di produrre risultati positivi borderline nel caso in cui si ottengano valori per l'indice di stimolazione (SI) compresi tra 1,8 e 2,5 (cfr. i punti 31-32). Tale considerazione è basata sulla banca dati di validazione di 44 sostanze e l'uso di un SI $\geq 1,8$ (cfr. il punto 6) nelle quali l'LLNA: DA ha correttamente individuato tutti i 32 sensibilizzanti dell'LLNA, ma ha erroneamente identificato tre delle 12 sostanze non sensibilizzanti dell'LLNA con valori SI compresi tra 1,8 e 2,5 (risultato borderline positivo) (10). Tuttavia, poiché lo stesso insieme di dati è stato usato per definire i valori SI e per calcolare le proprietà predittive del test, i risultati menzionati potrebbero essere una stima in eccesso delle reali proprietà predittive.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA: DA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione di linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa della sensibilizzazione. Tale proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media in ogni gruppo sperimentale con la proliferazione media nei controlli trattati con veicolo (VC). Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione media nel gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato con veicolo, definito "Indice di Stimolazione" (SI), che deve essere $\geq 1,8$ prima che una sostanza sperimentale possa ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. Le procedure qui descritte si basano sulla misurazione del contenuto di ATP tramite bioluminescenza (tecnica nota per il conteggio delle cellule vive) (17) per rilevare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio (18) (19). Il metodo della bioluminescenza utilizza l'enzima luciferasi per catalizzare la formazione di luce da ATP e luciferina in base alla seguente reazione:



L'intensità della luce emessa è linearmente correlata alla concentrazione di ATP ed è misurata mediante un luminometro. Il saggio luciferina-luciferasi è un metodo sensibile per la quantificazione degli ATP usato in un'ampia varietà di applicazioni (20).

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Gli studi di validazione per l'LLNA: DA sono stati condotti esclusivamente con il ceppo CBA/J, che pertanto è considerato il ceppo da preferire (12) (13). Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile usare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta LLNA: DA non esistono differenze significative per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (21), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 ore d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertarsi che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a un'esagerata procedura di estrazione in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile a una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta SIA ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la compatibilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA: DA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA: DA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione $SI \geq 1,8$ rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile ma non eccessiva (ad esempio, un $SI > 10$ sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0) e un 25 % di eugenolo (CAS 97-53-0) in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondono ai criteri di cui sopra.
12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli ≤ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA: DA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA: DA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).
13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA: DA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche devono essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati progressiva.
14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile possono essere messi in dubbio. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo di controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (22).

15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (23). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.
16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:
- somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame;
 - caratteristiche fisiche/chimiche note;
 - dati di supporto provenienti dall'LLNA: DA;
 - dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.
18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche (2) e (24). Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea locale (24) (25). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).
19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone: olio d'oliva (4:1 v/v), N,N-dimetilformamide, metiletilchetone, glicole propilenico e dimetilsolfossido (6), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.
20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 33). Inoltre, è possibile valutare la possibilità di ridurre il numero di topi nel gruppo di controllo positivo soltanto quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale (22). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. La regolare raccolta di dati individuali per singolo animale offre il vantaggio, dal punto di vista del benessere degli animali, di evitare di replicare i test, il che sarebbe invece indispensabile se i risultati sulla sostanza sperimentale raccolti originariamente con una modalità (ad esempio, raccogliendo dati aggregati) fossero successivamente considerati dalle autorità di regolamentazione assieme ad altri requisiti (ad esempio, dati individuali).

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18), è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di doser appropriato per l'LLNA: DA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nel principale studio LLNA: DA, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24)/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 23) La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o la concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.

22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA: DA, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppi di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazioni per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 8). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (25). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione), il giorno 7 (24 ore prima della conclusione dello studio) e il giorno 8. Inoltre, il giorno 8 lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia eseguita dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio $\geq 25\%$ in un qualsiasi giorno di misurazione (26) (27). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA: DA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazioni	Punteggio
Nessun eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (26) (27), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono stati associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (30) (31) (32) (33) (34).
24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (35) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA: DA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamiento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale $> 5\%$ dal giorno 1 al giorno 8, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (36).

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

- *Giorno 1*: Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Applicare una soluzione acquosa all'1 % di laurilsolfato di sodio (SLS) sulla parte posteriore di entrambe le orecchie utilizzando un pennello intinto nella soluzione SLS per coprire la parte di orecchio interessata con quattro-cinque pennellate. Un'ora dopo il trattamento con SLS, applicare 25 μL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.
- *Giorni 2, 3 e 7*: Ripetere il trattamento con soluzione acquosa all'1 % di SLS e la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.
- *Giorni 4, 5 e 6*: Nessun trattamento.
- *Giorno 8*: Registrare il peso di ciascun animale ed eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Circa 24-30 ore dopo l'inizio dell'applicazione il giorno 7, sottoporre gli animali a eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato (PBS) per ciascun animale separatamente. I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano nella bibliografia (22). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante ear punch weight determinations all'autopsia).

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Da ciascun topo si prepara una singola sospensione di cellule linfonodali asportate bilateralmente inserendo i linfonodi tra due vetrini ed esercitando una leggera pressione per schiacciare i linfonodi. Dopo essersi accertati di aver ottenuto un sottile strato di tessuto, aprire i vetrini. Porre il tessuto rimasto sui due vetrini in sospensione in una soluzione salina tampone fosfato (PBS): reggere un angolo di ciascun vetrino sopra la piastra di Petri e sciacquare con la soluzione, raschiando il tessuto dal vetrino con apposito raschietto. Poiché i linfonodi dei controlli negativi sono piccoli, è importante effettuare queste operazioni con attenzione per evitare di provocare effetti artificiali sui valori dell'indice di stimolazione. Per sciacquare i due vetrini è necessario un volume complessivo di soluzione PBS pari a 1 mL. La sospensione di linfonodi nella piastra di Petri dev'essere delicatamente omogeneizzata con il raschietto. Raccogliere 20 µL della sospensione con una micropipetta, facendo attenzione a non prelevare la membrana visibile a occhio nudo, e successivamente miscelare il tessuto prelevato con 1,98 mL di soluzione PBS fino a ottenere un campione di 2 mL. Preparare un secondo campione di 2 mL seguendo la medesima procedura, in modo da predisporre due campioni per ciascun animale.

Determinazione della proliferazione delle cellule (misurazione del contenuto di ATP nei linfociti)

27. Gli aumenti del contenuto di ATP nei linfonodi si misurano con il metodo luciferina/luciferasi avvalendosi di un kit ATP, che misura la bioluminescenza nelle unità di luminescenza relative (RLU). La durata del saggio, dal momento della soppressione dell'animale alla misurazione del contenuto di ATP per ciascun animale, dev'essere mantenuta uniforme, entro un arco temporale di circa 30 minuti, poiché si ritiene che il contenuto di ATP diminuisca gradualmente nel tempo dopo la morte dell'animale (12). Pertanto, la serie di procedure compresa tra l'escissione dei linfonodi auricolari e la misurazione degli ATP dev'essere ultimata entro 20 minuti, secondo il calendario prefissato che è lo stesso per ciascun animale. La luminescenza ATP si misura in ciascun campione di 2 mL in modo da raccogliere per ogni animale un totale di due misure ATP. In questo modo si determina la luminescenza ATP media, che verrà usata per i successivi calcoli (cfr. il punto 30).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

28. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (36).

Peso corporeo

29. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre individuare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

30. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. L'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi dell'RLU per topo calcolati per ogni gruppo di trattamento, compreso il controllo positivo, per la media dell'RLU per topo per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno.
31. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione $SI \geq 1,8$ (10). Tuttavia, per determinare se un risultato borderline (ossia un valore SI compreso tra 1,8 e 2,5) è dichiarato positivo (2) (3) (37), possono anche essere utilizzati la potenza del rapporto dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi.
32. Nel caso di una risposta positiva borderline con un valore SI compreso tra 1,8 e 2,5, per confermare che tali risultati sono positivi gli utilizzatori potrebbero voler prendere in considerazione informazioni aggiuntive come il rapporto dose-risposta, le prove di tossicità sistemica o irritazione eccessiva e, se del caso, la significatività statistica oltre che i valori SI (10). Inoltre, è necessario tener conto di diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea nel topo, nonché la natura del rapporto dose-risposta rilevato. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (4).
33. La raccolta di dati a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo trattato con veicolo/solvente parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati "aberranti").

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori RLU medi individuali, il valore RLU medio per ciascun animale, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo parallelo con veicolo/solvente.

Relazione sull'esecuzione del saggio

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

- dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);
- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

- dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);
- giustificazione per la scelta del veicolo;

Animali sperimentali

- origine dei topi del ceppo CBA;
- condizioni microbiologiche degli animali, se note;
- numero ed età degli animali;
- origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

- origine, numero di lotto, assicurazione della qualità/dati sul controllo della qualità del fabbricante per il kit ATP;
- dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;
- giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito;
- concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);
- dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;
- metodi di misurazione della tossicità;
- criteri per considerare gli studi positivi o negativi;
- dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

- riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usato;

- dati sui controlli positivi e/o negativi (solvente/veicolo), paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;
- se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

- peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e della soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;
- momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'eventuale irritazione cutanea nel punto di applicazione della somministrazione, per ciascun animale;
- momento dell'eliminazione dell'animale e momento della misurazione ATP per ciascun animale;
- tabella dei valori RLU individuali e dei valori SI per ciascun gruppo di trattamento;
- termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per valore RLU per topo per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento;
- indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo;
- rapporto dose-risposta;
- analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

- breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OCSE (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.pdf].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) OCSE (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OCSE (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3e: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/Tox_workshop.htm]
- (36) OCSE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.
- (38) OCSE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

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 rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con "concordanza" per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (38).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe avere 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 conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva.

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva.

Piccolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando le stesse sostanze di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (38).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: La misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (38).

Aberrante: un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e a procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti rispetto a coloro che eseguono le prove.

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (38).

Irritazione cutanea: Un processo immunologico che si verifica quanto un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): Un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

B.51. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: BrdU-ELISA

INTRODUZIONE

1. Le linee guida OCSE "Guidelines for the Testing of Chemicals" e i metodi di prova dell'UE sono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze a livello regolamentare e di considerazioni legate al benessere degli animali. Il primo metodo di prova (TM) (B.42) per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, il cosiddetto Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429) è stato rivisto (1, e capitolo B.42 del presente allegato). Sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla convalida dell'LLNA oltre che una revisione delle attività ad esso associate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Nell'LLNA si utilizzano timidina o iodina marcate con traccianti radioisotopici per misurare la proliferazione dei linfociti; di conseguenza, quando l'acquisizione, l'impiego o lo smaltimento della radioattività risultano problematici, il ricorso al saggio è limitato. L'LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, saggio immuno-assorbente legato a un enzima] è una variante non radioattiva del metodo LLNA, che utilizza 5-bromo-2-deossipurina (BrdU) non marcata [Chemical Abstracts Service (CAS) n. 59-14-3] in un sistema di prova basato su ELISA per misurare la proliferazione dei linfociti. Il saggio LLNA: BrdU-ELISA è stato convalidato e rivisto da un gruppo internazionale di esperti scientifici indipendenti, che ne raccomandano l'utilizzo perché considerato utile per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano o non provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti (10) (11) (12). Il presente metodo di prova è stato concepito per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. Il capitolo B.6 del presente allegato e la linea guida dell'OCSE "Test Guideline 406" utilizzano saggi sui porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (13). L'LLNA (capitolo B.42 del presente allegato; OCSE Test Guideline 429) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: BrdU-ELISA (capitolo B.51 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 B) e LLNA: DA (capitolo B.50 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 A), offrono tutti un vantaggio rispetto ai saggi sui porcellini d'India in B.6 e OCSE Test Guideline 406 (13) in termini di riduzione e perfezionamento dell'utilizzo di animali.

2. Simile all'LLNA, l'LLNA: BrdU-ELISA studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per una valutazione dose-risposta. Inoltre, la capacità del saggio di individuare sensibilizzanti cutanei senza la necessità di ricorrere a marcatori radioattivi per il DNA elimina il potenziale di esposizione professionale alla radioattività e le problematiche correlate allo smaltimento dei rifiuti. Ciò a sua volta può giustificare un accresciuto impiego dei topi per l'individuazione dei sensibilizzanti cutanei, che potrebbe ridurre ulteriormente l'uso dei porcellini d'India per testare il potenziale di sensibilizzazione cutanea (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13).

DEFINIZIONI

3. Le definizioni usate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Il saggio LLNA: BrdU-ELISA è una variante del metodo LLNA da usarsi per identificare le potenziali sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti specifici. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA: BrdU-ELISA vada usato in tutti i casi in sostituzione del metodo LLNA o dei test sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma (10) (11). Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza del saggio LLNA: BrdU-ELISA per la sostanza in questione [data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche con il LLNA: BrdU-ELISA (cfr. il punto 5)] e servono a scegliere la dose.
5. L'LLNA: BrdU-ELISA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo rispetto ai saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Inoltre, l'LLNA: BrdU-ELISA rappresenta un significativo miglioramento del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto perché, diversamente dal metodo B.6 e dalla linea guida OCSE Test Guideline 406, l'LLNA: BrdU-ELISA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA: BrdU-ELISA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India (capitolo B.6 del presente allegato, 13). Per questo motivo, l'LLNA: BrdU-ELISA riduce la sofferenza degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA: BrdU-ELISA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (13), occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 [ad esempio, i test con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei (tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi) (6) (1, e capitolo B.42 del presente allegato), la solubilità della sostanza di prova]. Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (15) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Si raccomanda di applicare anche all'LLNA: BrdU-ELISA (10) i limiti che sono stati individuati per l'LLNA (1, e capitolo B.42 del presente allegato). A parte tali limiti già rilevati, l'LLNA: BrdU-ELISA dovrebbe essere adatto per la sperimentazione di qualsiasi sostanza chimica, a meno che tale sostanza non possieda delle proprietà che possono interferire con l'accuratezza del saggio. Inoltre, non andrebbe esclusa la possibilità di produrre risultati positivi borderline nel caso in cui si ottengano valori per l'indice di stimolazione (SI) compresi tra 1,6 e 1,9 (cfr. i punti 31-32). Tale considerazione è basata su prove effettuate con la banca dati di validazione di 43 sostanze e l'uso di un SI $\geq 1,6$ (cfr. il punto 6), nelle quali l'LLNA: BrdU-ELISA ha correttamente individuato tutti i 32 sensibilizzanti dell'LLNA, ma ha erroneamente identificato due delle 11 sostanze non sensibilizzanti dell'LLNA con valori SI compresi tra 1,6 e 1,9 (risultato borderline positivo) (10). Tuttavia, poiché lo stesso insieme di dati è stato usato per definire i valori SI e per calcolare le proprietà predittive del test, i risultati menzionati potrebbero essere una stima in eccesso delle reali proprietà predittive.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA: BrdU-ELISA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione di linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa della sensibilizzazione. Tale proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media in ogni gruppo sperimentale con la proliferazione media nei controlli trattati con veicolo (VC). Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione media nel gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato con veicolo, definito "Indice di Stimolazione" (SI), che deve essere $\geq 1,6$ prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. Le procedure qui descritte si basano sulla misurazione del contenuto di BrdU per rilevare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio. BrdU è un analogo della timidina, anch'esso similmente incorporato nel DNA delle cellule in fase di proliferazione. Il metodo ELISA misura l'incorporazione di BrdU, utilizzando un anticorpo specifico per BrdU che è marcato anche con perossidasi. Quando il substrato viene aggiunto, la perossidasi reagisce con il substrato per generare un prodotto colorato che è quantificato in una specifica assorbanza con un lettore di micropiastra.

DESCRIZIONE DEL SAGGIO**Selezione delle specie animali**

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Gli studi di validazione per l'LLNA: BrdU-ELISA sono stati condotti esclusivamente con il ceppo CBA/JN, che pertanto è considerato il ceppo da preferire (10) (12). Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile usare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta LLNA: BrdU-ELISA non esistono differenze significative per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (16), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C ± 3 °C. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertarsi che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a un'esagerata procedura di estrazione in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile, come una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta sia ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la comparabilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA: BrdU-ELISA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA: BrdU-ELISA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione $SI \geq 1,6$ rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o una tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile ma non eccessiva (ad esempio, un $SI > 14$ sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0) e un 25 % di eugenolo (CAS 97-53-0) in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra.
12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli ≤ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA: BrdU-ELISA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA: BrdU-ELISA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).
13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA: BrdU-ELISA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche devono essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati progressiva.

14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile possono essere messi in dubbio. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo dei controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (17).
15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (18). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.
16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze sperimentali. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:
- somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame;
 - caratteristiche fisiche/chimiche note;
 - dati di supporto provenienti dall'LLNA: BrdU-ELISA;
 - dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11- 15). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.
18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche 2 e 19. Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea a livello locale (19)(20 e capitolo B.4 del presente allegato). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).
19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone: olio di oliva (4:1 v/v), *N,N*-dimetilformammide, metiletilchetone, glicole propilenico e dimetilsolfossido (6), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.
20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 33). Inoltre, è possibile valutare la possibilità di ridurre il numero di topi nel gruppo del controllo positivo soltanto quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale (17). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. La raccolta di dati individuali per singolo animale offre il vantaggio, dal punto di vista del benessere degli animali, di evitare di replicare i test, il che sarebbe invece indispensabile se i risultati sulla sostanza sperimentale raccolti originariamente con una modalità (ad esempio, raccogliendo dati aggregati) fossero successivamente considerati dalle autorità di regolamentazione assieme ad altri requisiti (ad esempio, dati individuali).

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18) è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di dose appropriato per l'LLNA: BrdU-ELISA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nel principale studio LLNA: BrdU-ELISA, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24) e/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 23). La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o la concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.
22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA: BrdU-ELISA principale, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppi di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazioni per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 6). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (20, e capitolo B.4 del presente allegato). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione) e il giorno 6. Inoltre, il giorno 6 lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia eseguita dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un qualsiasi giorno di misurazione (21) (22). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA: BrdU-ELISA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazione	Punteggio
Nessun segno di eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (21) (22), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (25) (26) (27) (28) (29).
24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (30) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA: BrdU-ELISA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamiento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 6, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (31).

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:
- *Giorno 1:* Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Applicare 25 μ L della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.
 - *Giorni 2 e 3:* Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.
 - *Giorno 4:* Nessun trattamento.
 - *Giorno 5:* Somministrare 0,5 mL (5 mg/topo) di soluzione BrdU (10 mg/mL) mediante iniezione intraperitoneale.

- *Giorno 6*: Registrare il peso di ciascun animale. Circa 24 ore (24 h) dopo la somministrazione di BrdU, gli animali vanno sottoposti ad eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato per ciascun animale separatamente. I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano alla voce bibliografica (17). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante biopsie effettuate all'autopsia).

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Mediante delicata disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 µm o un'altra tecnica accettabile (ad esempio, uso di un pestello in plastica usa e getta per schiacciare i linfonodi, seguito dal passaggio su un filtro di nylon #70) si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali asportate bilateralmente. La procedura per la preparazione della sospensione cellulare è fondamentale in questo saggio e, pertanto, ogni operatore deve aver già acquisito la necessaria perizia. Oltretutto, negli animali per i controlli negativi i linfonodi sono piccoli, cosicché è necessario intervenire con attenzione per evitare effetti artificiali sui valori SI. In ogni caso, il volume bersaglio della sospensione cellulare deve essere aggiustato fino a ottenere un determinato volume ottimizzato (circa 15 mL). Il volume ottimizzato si basa sul raggiungimento di un'assorbanza media del gruppo del controllo negativo compresa tra 0,1 e 0,2.

Determinazione della proliferazione delle cellule (misurazione del contenuto di BrdU nel DNA dei linfociti)

27. Il metodo ELISA misura il BrdU utilizzando un kit commerciale (ad esempio, Roche Applied Science, Mannheim, Germania, numero di catalogo 11 647 229 001). In breve, si aggiungono 100 µL della sospensione cellulare ai pozzi di una micropiastra a fondo piatto in triplice copia. Dopo la fissazione e la denaturazione della sospensione, a ogni pozzo si aggiunge un anticorpo anti-BrdU che viene lasciato reagire. Successivamente l'anticorpo anti-BrdU viene asportato tramite lavaggio e viene aggiunta la soluzione di substrato, lasciando il tempo sufficiente a produrre il cromogeno. Si misura quindi l'assorbanza a 370 nm con una lunghezza d'onda di riferimento di 492 nm. In tutti i casi, le condizioni di prova devono essere ottimizzate (cfr. il punto 26).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

28. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (31).

Peso corporeo

29. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre individuare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

30. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. L'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi dell'indice di marcatura con BrdU per topo calcolati per ogni gruppo di trattamento, compreso il gruppo di controllo positivo, per la media dell'indice di marcatura con BrdU per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno.

L'indice di marcatura con BrdU è così definito:

$$\text{Indice di marcatura con BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS vuoto}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS vuoto}_{\text{ref}})$$

dove em = lunghezza d'onda delle emissioni e ref = lunghezza d'onda di riferimento.

31. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione $SI \geq 1,6$ (10). Tuttavia, per determinare se un risultato borderline (ossia un valore SI compreso tra 1,6 e 1,9) è dichiarato positivo (3) (6) (32), possono anche essere utilizzati la potenza del rapporto dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi.
32. Nel caso di una risposta positiva borderline con un valore SI compreso tra 1,6 e 1,9, per confermare che tali risultati sono positivi gli utenti potrebbero voler prendere in considerazione informazioni aggiuntive come il rapporto dose-risposta, le prove di tossicità sistemica o irritazione eccessiva e, se del caso, la significatività statistica oltre che i valori SI (10). Inoltre, è necessario tener conto di diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea nel topo, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (4).

33. La raccolta di dati a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo trattato con veicolo/solvente parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati "aberranti").

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori medi individuali dell'indice di marcatura con BrdU, il valore medio dell'indice di marcatura con BrdU per ciascun animale per gruppo, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo parallelo con veicolo/solvente.

Relazione sull'esecuzione del saggio

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

- dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);
- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

- dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);
- giustificazione per la scelta del veicolo;

Animali sperimentali

- origine dei topi del ceppo CBA;
- condizioni microbiologiche degli animali, se note;
- numero ed età degli animali;
- origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

- origine, numero di lotto, assicurazione della qualità/dati sul controllo della qualità del fabbricante (sensibilità e specificità anticorpale e limite di rilevazione) per il kit ELISA;
- dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;
- giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito;
- concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);
- dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;
- metodi di misurazione della tossicità;

- criteri per considerare gli studi positivi o negativi;
- dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

- riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usato;
- dati sui controlli positivi e negativi (solvente/veicolo), paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;
- se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

- peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e della soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;
- momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'eventuale irritazione cutanea nel punto di applicazione della somministrazione, per ciascun animale;
- tabella degli indici di marcatura con BrdU individuali e dei valori SI per ciascun gruppo di trattamento;
- termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per indice di marcatura con BrdU per topo per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento;
- indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo;
- rapporto dose-risposta;
- analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

- breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OCSE (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OCSE (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OCSE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/BRDcomplete.pdf>].

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

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 rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con "concordanza" per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (33).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento deve avere 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 conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva (33).

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva (33).

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando la stessa sostanza di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (33).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: la misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (33).

Aberrante: Un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e a procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti rispetto a coloro che eseguono le prove.

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (33).

Irritazione cutanea: un processo immunologico che si verifica quando un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.»
