

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 442C (2015). Un sensibilizzante cutaneo è una sostanza che determina una risposta allergica a seguito del contatto con la pelle, secondo la definizione del Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (UN GHS) delle Nazioni Unite (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 dell'Unione europea relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ⁽¹⁾. Il presente metodo di prova descrive una procedura *in chemico* (saggio di reattività peptidica diretta — DPRA) da utilizzare per distinguere i sensibilizzanti dai non sensibilizzanti, secondo la definizione del sistema UN GHS e della classificazione CLP.

Vi è consenso generale circa le principali fasi del processo biologico di sensibilizzazione cutanea. Le conoscenze attuali dei meccanismi chimico-biologici associati alla sensibilizzazione cutanea sono stati sintetizzati nel concetto del meccanismo d'azione degli eventi avversi (*Adverse Outcome Pathway* — AOP) (2), dall'evento molecolare scatenante fino agli effetti avversi per la salute (dermatite allergica da contatto negli esseri umani o ipersensibilità da contatto nei roditori) passando attraverso le fasi intermedie. Nel caso dell'AOP relativo alla sensibilizzazione cutanea l'evento molecolare scatenante è il legame covalente tra sostanze chimiche elettrofile e i centri nucleofili nelle proteine della pelle.

Generalmente, la valutazione della sensibilizzazione cutanea è effettuata su cavie. I metodi classici che utilizzano le cavie GMPT (*Guinea Pig Maximisation Test*) di Magnusson e Kligman e il test di Buehler (metodo di prova B.6 (3)), studiano sia le fasi di induzione che quelle di reazione della sensibilizzazione cutanea. Sono utilizzati inoltre un test sui topi, il test sui linfonodi locali (LLNA, metodo di prova B.42 (4)) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: DA (TM B.50 (5)) e LLNA: BrdU-ELISA (metodo di prova B.51 (6)), che riguardano esclusivamente la reazione di induzione, garantendo un vantaggio rispetto ai test che utilizzano le cavie per quanto riguarda il benessere degli animali e la possibilità di ottenere una misurazione obiettiva della fase di induzione della sensibilizzazione cutanea.

Più di recente sono stati considerati scientificamente validi per la valutazione del rischio di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche metodi *in chemico* e *in vitro* di tipo meccanicistico. Tuttavia, sarà necessario combinare metodi diversi dalla sperimentazione animale (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) nell'ambito delle metodologie integrate di prova e valutazione (*IATA* — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) per poter sostituire integralmente le prove sugli animali attualmente in uso, tenuto conto della limitata copertura meccanicistica dell'AOP di ciascuno dei metodi di prova senza ricorso agli animali (2) (7).

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

Il DPRA viene proposto per lo studio dell'evento molecolare scatenante nell'AOP relativo alla sensibilizzazione cutanea, ovvero la reattività proteica, mediante quantificazione della reattività delle sostanze chimiche in esame a modelli peptidici di sintesi contenenti lisina o cisteina (8). I valori percentuali di deplezione dei peptidi con cisteina e lisina sono quindi utilizzati per classificare le sostanze in una delle quattro classi di reattività al fine di contribuire a distinguere i sensibilizzanti dai non sensibilizzanti cutanei (9).

Il DPRA è stato oggetto di uno studio di validazione in uno dei laboratori di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing — EURL ECVAM*) e di una successiva revisione inter pares sotto la guida del comitato scientifico consultivo dello stesso laboratorio (ESAC) ed è stato considerato scientificamente valido (10) per essere impiegato nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA, in modo da distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. Nella letteratura scientifica figurano esempi dell'uso dei dati DPRA in combinazione con altre informazioni (11) (12) (13) (14).

Le definizioni sono riportate nell'appendice I.

CONSIDERAZIONI PRELIMINARI, APPLICABILITÀ E LIMITI

La correlazione tra reattività proteica e potenziale di sensibilizzazione cutanea è ben documentata (15) (16) (17). Tuttavia, poiché il legame alle proteine costituisce solo uno degli eventi fondamentali dell'AOP sensibilizzazione cutanea, pur trattandosi dell'evento molecolare scatenante, le informazioni relative alla reattività alle proteine ottenute con metodi sperimentali e non sperimentali possono non essere di per sé sufficienti a decretare l'assenza di un potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche. È opportuno pertanto considerare i dati generati utilizzando il presente metodo di prova nel contesto di metodologie integrate quali IATA, combinandoli con altre informazioni complementari, ricavate ad esempio da test in vitro che prendano in esame altri eventi fondamentali della sensibilizzazione cutanea AOP come pure da metodi non sperimentali, compreso quello del *read-across* in relazione a sostanze chimiche analoghe.

Il presente metodo di prova può essere utilizzato, in combinazione con altre informazioni complementari, per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti cutanei (ad esempio, categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti cutanei nell'ambito di un approccio integrato (IATA). Il presente metodo di prova non può essere utilizzato isolatamente, né per dividere i sensibilizzanti cutanei in sottocategorie 1A e 1B, quali definite dal GHS dell'ONU/CLP, né per prevedere la potenza di sensibilizzazione in sede di valutazione della sicurezza. Tuttavia, in funzione del quadro normativo applicabile, un risultato positivo ottenuto applicando il DPRA può essere usato isolatamente per classificare una sostanza chimica nella categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP.

È stato dimostrato che il metodo di prova DPRA può essere applicato in laboratori con esperienza nel campo dell'analisi mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Il livello di riproducibilità delle previsioni che ci può aspettare dal metodo di prova è nell'ordine dell'85 % a livello intra-laboratorio e dell'80 % a livello inter-laboratorio (10). I risultati dello studio di validazione (18) e degli studi pubblicati (19) indicano globalmente che l'accuratezza del DPRA nella distinzione tra sensibilizzanti (ad esempio, categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti è pari all'80 % (N=157) per una sensibilità dell'80 % (88/109) e una specificità del 77 % (37/48) rispetto ai risultati ottenuti con il LLNA. È probabile che il metodo DPRA sottostimi le sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (ad esempio, sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) rispetto alle sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea elevata (ad esempio, sottocategoria 1A del GHS dell'ONU/CLP) (18) (19). Tuttavia, i valori di accuratezza forniti in questa sede per il DPRA in quanto metodo utilizzato isolatamente sono squisitamente indicativi, in quanto il metodo di prova dovrebbe essere considerato in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni del precedente punto 9. Inoltre, nel valutare i metodi di studio della sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che il LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, possono non riflettere interamente la situazione per la specie di interesse, ovvero gli esseri umani. I dati generali disponibili indicano che il DPRA è applicabile alle sostanze chimiche in esame relative a diversi gruppi funzionali organici, meccanismi di reazione, potenza di sensibilizzazione cutanea (quale determinata dagli studi in vivo) e proprietà fisico-chimiche (8) (9) (10) (19). Queste informazioni, nel loro insieme, indicano l'utilità del DPRA per l'identificazione del rischio di sensibilizzazione cutanea.

Il termine “sostanza chimica in esame” utilizzato nel presente metodo di prova designa l'oggetto della prova e non si riferisce all'applicabilità del DPRA alle prove di sostanze e/o miscele. Il presente metodo di prova non è applicabile alle prove di composti di metalli in quanto è noto che essi reagiscono con le proteine con meccanismi differenti dal legame covalente. Una sostanza chimica in esame dovrebbe essere solubile in un solvente adeguato a una concentrazione finale di 100 mM (cfr. il punto 18). Tuttavia, le sostanze chimiche in esame non solubili a tale concentrazione possono essere sottoposte a prova a concentrazioni inferiori. In questo caso un risultato positivo può essere utilizzato per individuare una sostanza chimica in esame come sensibilizzante cutaneo; un risultato negativo, invece, non dovrebbe permettere di trarre conclusioni negative quanto alla mancanza di reattività. Attualmente disponiamo di informazioni limitate quanto all'applicabilità del DPRA alle miscele di composizione conosciuta (18) (19). Si ritiene tuttavia che il DPRA sia tecnicamente applicabile alle prove di sostanze multi-costituenti e alle miscele di composizione conosciuta (cfr. punto 18). Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tale verifica non è necessaria se la miscela viene sottoposta a prova in ottemperanza a un obbligo regolamentare. L'attuale modello predittivo non può essere utilizzato con le miscele complesse la cui composizione è sconosciuta o le sostanze di composizione sconosciuta o variabile, i prodotti di una reazione complessa o i materiali origine biologica (ovvero le sostanze UVCB) a causa del rapporto molare definito della sostanza chimica in esame e del peptide. A tal fine è necessario elaborare un nuovo modello predittivo basato su un metodo gravimetrico. Il metodo di prova non deve essere utilizzato con altre categorie specifiche di sostanze chimiche qualora possa essere dimostrata la sua non applicabilità a tali categorie specifiche.

Il presente metodo di prova è del tipo *in chemico* che non prevede l'intervento di un sistema metabolico. Le sostanze chimiche che necessitano di una bioattivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea (ad esempio, i pro-apteni) non possono essere individuate applicando il presente metodo di prova. In alcuni casi, le sostanze chimiche che diventano sensibilizzanti in seguito a una trasformazione abiotica (ad esempio, i pre-apteni) sono correttamente individuate dal metodo di prova (18). Alla luce di quanto precede, i risultati negativi ottenuti applicando il metodo di prova dovrebbero essere interpretati nel contesto dei limiti indicati e in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA. Le sostanze chimiche in esame che non presentano un legame covalente con il peptide ma che ne favoriscono l'ossidazione (ad esempio, dimerizzazione della cisteina) potrebbero determinare una sopravvalutazione della deplezione peptidica risultante in eventuali falsi positivi e/o nell'assegnazione della sostanza a una classe di reattività più elevata (cfr. punti 29 e 30).

Come descritto il precedenza, il DPRA aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Tuttavia, esso potrebbe contribuire anche alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea (11) se utilizzato nell'ambito di approcci integrati quali IATA. Sono tuttavia necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare in che modo il DPRA possa contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Il DPRA è un metodo di prova *in chemico* che permette di quantificare la concentrazione residua di peptide contenente cisteina o lisina dopo 24 ore di incubazione con la sostanza chimica in esame a una temperatura di 25 (\pm 2,5) °C. I peptidi di sintesi contengono fenilalanina per facilitare l'individuazione. La concentrazione peptidica relativa è misurata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con eluizione a gradiente e rivelatore UV a 220 nm. I valori percentuali di deplezione dei peptidi con cisteina e lisina sono quindi calcolati e utilizzati in un modello predittivo (cfr. punto 29) che consente di assegnare la sostanza chimica in esame a una delle quattro classi di reattività utilizzate per distinguere la sensibilizzazione dalla non sensibilizzazione cutanea.

Prima di utilizzare il presente metodo di prova per prove di routine, i laboratori dovrebbero dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 2.

PROCEDURA

Il presente metodo di prova si basa sul protocollo DPRA DB-ALM n° 154 (20) utilizzato per lo studio di validazione coordinato dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (EURL ECVAM). Si raccomanda di utilizzare questo protocollo nell'applicazione e nell'impiego del metodo in laboratorio. Di seguito è fornita una descrizione dei principali elementi e procedure del DPRA. Qualora venga utilizzata una configurazione alternativa della HPLC, è necessario dimostrarne l'equivalenza con la configurazione convalidata descritta nel protocollo DB-ALM (ad esempio, sottoponendo a prova le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2).

Preparazione dei peptidi contenenti cisteina o lisina

Soluzioni madre dicisteina (Ac-RFAACAA-COOH) e lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) contenenti peptidi di sintesi di purezza superiore all'85 %, ma di preferenza compresa tra il 90 e il 95 %, dovrebbero essere preparate al momento dell'uso e immediatamente prima dell'incubazione con la sostanza chimica in esame. La concentrazione finale del peptide con cisteina deve essere pari a 0,667 mM in tampone fosfato a pH 7,5 mentre la concentrazione finale del peptide con lisina deve essere pari a 0,667 mM in tampone di acetato ammonico a pH 10,2. Le sequenze di analisi HPLC devono essere programmate per fare in modo che l'analisi HPLC non superi le 30 ore. Per l'analisi HPLC utilizzata nello studio di convalida e descritta nel presente metodo di prova possono essere impiegati fino a 26 campioni di analisi (comprendenti la sostanza chimica in esame, il controllo positivo e il numero appropriato di controlli con solvente sulla base del numero di singoli solventi utilizzati nella prova, ciascuno sottoposto a prova in tre repliche) in un'unica sequenza HPLC. Tutte le repliche analizzate nella stessa sequenza devono utilizzare le stesse soluzioni madre di peptide con cisteina e lisina. Si raccomanda di verificare l'adeguata solubilità dei singoli lotti di peptide prima del loro utilizzo.

Preparazione della sostanza chimica in esame

La solubilità della sostanza chimica in esame in un solvente adeguato deve essere verificata prima della prova applicando il metodo di solubilizzazione descritto nel protocollo DPRA DB-ALM (20). Per solvente adeguato si intende quello che permette di dissolvere completamente la sostanza chimica in esame. Nel DPRA la sostanza chimica in esame è incubata in forte eccesso con i peptidi contenenti cisteina o lisina; pertanto un'ispezione visiva che verifichi la formazione di una soluzione chiara è considerata sufficiente per accertare che la sostanza chimica in esame (e tutti i suoi costituenti qualora si sottoponga a prova una sostanza multi-costituente o una miscela) sia dissolta. Solventi adeguati sono l'acetonitrile, l'acqua, una miscela 1:1 di acqua: acetonitrile, l'isopropanolo, l'acetone o una miscela 1:1 di acetone: acetonitrile. Possono essere utilizzati anche altri solventi, a condizione che non abbiano un impatto sulla stabilità del peptide monitorata con i controlli di riferimento C (ovvero campioni costituiti dal solo peptide dissolto nel solvente appropriato; cfr. appendice 3). Come ultima opzione, qualora la sostanza chimica in esame non sia solubile in nessuno dei citati solventi, si può cercare di solubilizzarla in 300 µL di DMSO diluendo la soluzione risultante in 2 700 µL di acetonitrile; se la sostanza chimica in esame non è solubile nemmeno in questa miscela si può provare a solubilizzare la sostanza chimica in esame in 1 500 µL di DMSO diluendo la soluzione risultante in 1 500 µL di acetonitrile. La sostanza chimica in esame deve essere prepesata in recipienti di vetro e dissolta immediatamente prima della prova in un solvente appropriato per preparare una soluzione a 100mM. Nel caso delle miscele e delle sostanze multi-costituenti di composizione nota, si deve determinare un singolo livello di purezza sommando la proporzione dei costituenti (esclusa l'acqua) e un singolo peso molecolare apparente, considerando il singolo peso molecolare di ciascuno dei costituenti della miscela (esclusa l'acqua) e le relative proporzioni. La purezza e il peso molecolare apparente che ne risultano sono quindi utilizzati per calcolare il peso della sostanza chimica in esame necessario per preparare una soluzione a 100 mM. Nel caso di polimeri per i quali non sia possibile determinare un peso molecolare predominante, per preparare la soluzione a 100 mM si può prendere in considerazione il peso molecolare del monomero (o il peso molecolare apparente dei diversi monomeri che costituiscono il polimero). Tuttavia quando si sottopongono a prova miscele, sostanze multi-costituenti o polimeri di composizione nota, si dovrebbe considerare anche la possibilità di sottoporre a prova la sostanza chimica pura. Nel caso dei liquidi la sostanza chimica pura deve essere sottoposta a prova senza diluirla preventivamente ma incubandola con peptidi contenenti cisteina e lisina aventi un rapporto molare pari a rispettivamente 1:10 e 1:50. Nel caso dei solidi la sostanza chimica in esame deve essere dissolta alla sua concentrazione massima di solubilità nello stesso solvente utilizzato per preparare la soluzione apparente a 100 mM. La sostanza chimica in esame deve essere quindi sottoposta a prova senza diluirla ulteriormente, incubandola con peptidi contenenti cisteina e lisina aventi un rapporto pari a rispettivamente 1:10 e 1:50. Risultati concordanti (reattivi o non reattivi) tra la soluzione apparente a 100 mM e la sostanza chimica pura dovrebbero consentire di formulare conclusioni definitive.

Preparazione del controllo positivo, dei controlli di riferimento e dei controlli di co-eluzione

Come controllo positivo viene utilizzata l'aldeide cinnamica (CAS 104-55-2; purezza grado alimentare ≥ 95 %) a una concentrazione di 100 mM in acetonitrile. Altri controlli positivi adeguati, che forniscano di preferenza valori di deplezione medi, possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la sequenza. Nella sequenza di analisi HPLC devono inoltre essere inclusi controlli di riferimento (ovvero campioni contenenti esclusivamente il peptide dissolto nel solvente appropriato) da utilizzare per verificare l'adeguatezza del sistema HPLC prima di procedere all'analisi (controlli di riferimento A), la stabilità nel tempo dei controlli di riferimento (controlli di riferimento B) e accertarsi che il solvente utilizzato per dissolvere la sostanza chimica in esame non abbia un impatto sulla percentuale di deplezione del peptide (controlli di riferimento C) (cfr. appendice 3). Per ciascuna sostanza chimica viene utilizzato un controllo di riferimento appropriato al fine di calcolare la percentuale di deplezione del peptide (cfr. punto 26). Inoltre, per ciascuna sostanza chimica in esame deve essere incluso nella sequenza un controllo di co-eluzione costituito dalla sola sostanza chimica in esame allo scopo di individuare un'eventuale co-eluzione della sostanza chimica in esame con il peptide contenente lisina o cisteina.

Incubazione della sostanza chimica in esame con le soluzioni di peptide contenenti cisteina e lisina

Le soluzioni di peptide contenenti cisteina e lisina devono essere incubate in dispensatori automatici di vetro con la sostanza chimica in esame con un rapporto pari a rispettivamente 1:10 e 1:50. Se si osserva un precipitato immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione con la sostanza chimica in esame alla soluzione con il peptide a causa della ridotta idrosolubilità della sostanza chimica in esame, non è possibile conoscere con certezza il quantitativo di tale sostanza rimasto nella soluzione che potrebbe reagire con il peptide. In questi casi, pertanto, mentre si può utilizzare un risultato positivo, un risultato negativo va interpretato con la dovuta cautela (cfr. anche le disposizioni del punto 11 per le prove delle sostanze chimiche non solubili fino a concentrazioni di 100 mM). La soluzione di reazione deve essere conservata al buio a $25(\pm 2,5)$ C per 24 ± 2 ore prima di procedere all'analisi HPLC. Ciascuna sostanza chimica in esame deve essere analizzata in tre repliche per entrambi i peptidi. Prima dell'analisi HPLC i campioni devono essere ispezionati visivamente. Qualora si osservi un precipitato o una separazione di fase, è opportuno centrifugare i campioni a bassa velocità ($100-400 \times g$) per far scendere il precipitato in fondo al recipiente, in quanto un eccesso di precipitato potrebbe ostruire i tubi o le colonne del cromatografo. Qualora si osservi un precipitato o una separazione di fase dopo il periodo di incubazione, la deplezione dei peptidi può essere sottostimata e, in caso di risultato negativo, non è possibile stabilire con sufficiente certezza una mancanza di reattività.

Preparazione della curva di taratura standard HPLC

Per entrambi i peptidi con cisteina e lisina deve essere generata una curva di taratura standard. Gli standard di peptidi sono preparati in una soluzione del 20 % o 25 % di acetonitrile: tampone utilizzando un tampone di fosfato (pH 7,5) per il peptide con cisteina e un tampone di acetato ammonico (pH 10,2) per il peptide con lisina. Utilizzando standard ottenuti per diluizione in serie della soluzione madre di peptide (0,667 mM), sono preparate 6 soluzioni di taratura comprese tra 0,534 e 0,0167 mM. Nella curva di taratura standard è inserito un bianco costituito dal tampone di diluizione. Una curva di taratura adeguata presenta un coefficiente di $r^2 > 0,99$.

Preparazione e analisi HPLC

Prima di effettuare l'analisi deve essere verificata l'adeguatezza del sistema HPLC. La deplezione dei peptidi è misurata con la HPLC associata a un rivelatore UV (un rivelatore a serie di fotodiodi o un rivelatore ad assorbanza UV di lunghezza d'onda pari a 220nm). La colonna appropriata è installata nel sistema HPLC. La configurazione HPLC descritta nel protocollo validato utilizza di preferenza una colonna Zorbax SB-C-18 2,1 mm \times 100 mm \times 3,5 μ m. Con questa colonna HPLC a fase inversa l'intero sistema deve essere equilibrato a 30 °C con il 50 % di fase A (0,1 % (v/v) di acido trifluoroacetico in acqua) e il 50 % di fase B (0,085 % (v/v) di acido trifluoroacetico in

acetone nitrile) per almeno due ore prima dell'esecuzione dell'analisi. L'analisi HPLC deve essere effettuata utilizzando una portata di 0,35 ml/min e un gradiente lineare compreso tra il 10 % e il 25 % di acetone nitrile per 10 minuti seguita da un rapido aumento dell'acetone nitrile (fino al 90 %) allo scopo di eliminare gli altri materiali. Devono essere iniettati volumi uguali di ciascuno standard, campione e controllo. Tra le iniezioni la colonna deve essere riequilibrata alle condizioni iniziali per 7 minuti. Qualora venga utilizzata una differente colonna HPLC a fase inversa, può rivelarsi necessario adeguare i parametri di configurazione sopraindicati per assicurare una eluzione e integrazione adeguate dei peptidi con cisteina e lisina, compreso il volume iniettato, che può variare a seconda del sistema utilizzato (di solito compreso tra 3 e 10 µl). Qualora venga utilizzata una configurazione alternativa della HPLC, è essenziale dimostrarne l'equivalenza con la configurazione convalidata sopradescritta (ad esempio, sottoponendo a prova le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2). L'assorbanza è misurata a 220 nm. Qualora sia utilizzato un rivelatore a serie di fotodiodi deve essere rilevata anche l'assorbanza a 258 nm. Va segnalato che taluni lotti di acetone nitrile possono avere un'incidenza negativa sulla stabilità del peptide e che quest'ultima deve essere valutata quando si utilizza un nuovo lotto di acetone nitrile. Il rapporto tra l'area di picco a 220 nm e l'area di picco a 258 nm può essere utilizzato come indicatore della co-eluzione. Per ciascun campione un rapporto compreso tra il 90 % e il 100 % della media ⁽¹⁾ dei rapporti delle superfici ottenuti per i campioni di controllo costituisce un buon indicatore del fatto che non vi è stata co-eluzione.

Determinate sostanze chimiche in esame possono favorire l'ossidazione del peptide con cisteina. Il picco del peptide con cisteina dimerizzato può essere verificato visivamente. Qualora si ritenga che si è verificata una dimerizzazione, occorre segnalarlo, in quanto la percentuale della deplezione del peptide può essere sovrastimata e determinare previsioni di falsi positivi e/o l'assegnazione della sostanza a una classe di reattività più elevata (cfr. punti 29 e 30).

L'analisi HPLC dei peptidi con cisteina e lisina può essere effettuata nello stesso momento (se sono disponibili due sistemi HPLC) o in giorni diversi. Se l'analisi è effettuata in giorni diversi, è necessario preparare sul momento tutte le soluzioni delle sostanze chimiche in esame prima di ciascuna analisi. L'analisi deve essere programmata in modo da garantire che l'iniezione del primo campione inizi tra 22 e 26 ore dopo la miscelazione della sostanza chimica in esame con la soluzione peptidica. Le sequenze di analisi HPLC devono essere programmate per fare in modo che l'analisi HPLC non superi le 30 ore. Per l'analisi HPLC utilizzata nello studio di validazione e descritta nel presente metodo di prova possono essere impiegati fino a 26 campioni di analisi in un'unica sequenza HPLC (si veda anche il punto 17). L'appendice 3 presenta un esempio di sequenza di analisi HPLC.

DATI E RELAZIONE

Valutazione dei dati

La concentrazione del peptide con cisteina e lisina è determinata con metodo fotometrico a 220 nm in ciascun campione misurando l'area di picco (l'area al di sotto della curva, AUC) nei picchi appropriati e calcolando la concentrazione peptidica mediante la curva lineare di taratura derivata dagli standard.

La percentuale di deplezione dei peptidi è determinata in ciascun campione misurando l'area dei picchi dei pertinenti controlli di riferimento C (cfr. appendice 3), applicando la formula riportata di seguito.

$$\text{Percentuale di deplezione del peptide} = \left[1 - \left(\frac{\text{Area di picco del peptide nell' iniezione della replica}}{\text{Area di picco media del peptide nei controlli di riferimento C}} \right) \right] \times 100$$

Criteri di accettabilità

Affinché una sequenza sia considerata valida, devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- la curva di taratura standard presenta un coefficiente di $r^2 > 0,99$;

⁽¹⁾ In tutto il presente documento con "media" si intende la media aritmetica.

- b) la percentuale media di deplezione dei peptidi delle tre repliche per il controllo positivo aldeide cinnamica deve essere compreso tra il 60,8 % e il 100 % per il peptide con cisteina e tra il 40,2 % e il 69 % per il peptide con lisina e la deviazione standard massima per le repliche del controllo positivo deve essere < 14,9 % per il tasso di deplezione della cisteina e < 11,6 % per il tasso di deplezione della lisina, e
- c) la concentrazione peptidica media dei controlli di riferimento A deve essere pari a $0,50 \pm 0,05$ mM e il coefficiente di variazione delle aree di picco del peptide per i nove controlli di riferimento B e C del peptide in acetonitrile pari a < 15,0 %.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto è necessario ripetere la sequenza.

Affinché i risultati per la sostanza chimica in esame siano considerati validi, devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- a) la deviazione standard massima per le repliche della sostanza chimica in esame deve essere < 14,9 % per il tasso di deplezione della cisteina e < 11,6 % per il tasso di deplezione della lisina;
- b) la concentrazione peptidica media dei tre controlli di riferimento C nel solvente appropriato deve essere pari a $0,50 \pm 0,05$ mM. Se non sono soddisfatti questi criteri, i dati non sono accolti ed è necessario ripetere la sequenza per la sostanza chimica in esame.

Modello predittivo

Il valore del tasso medio di deplezione della cisteina e della lisina è calcolato per ciascuna sostanza chimica in esame. Per il calcolo della media una deplezione negativa è considerata pari a "0". Se si utilizza il modello predittivo cisteina 1:10/lisina 1:50 di cui alla tabella 1, per l'individuazione dei sensibilizzanti e dei non sensibilizzanti nell'ambito di un approccio IATA si utilizza una soglia del 6,38 % di deplezione media dei peptidi. L'applicazione del modello predittivo per assegnare una sostanza chimica in esame a una classe di reattività (ad esempio, bassa, moderata ed elevata) potrebbe rivelarsi utile per valutare la potenza di sensibilizzazione nell'ambito di un approccio IATE.

Tabella 1

Modello predittivo ⁽¹⁾ cisteina 1:10/lisina 1:50

Media % di deplezione della cisteina e della lisina	Classe di reattività	Previsione DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ % media di deplezione ≤ 6,38 %	Reattività nulla o minima	Negativa
6,38 < % media di deplezione ≤ 22,62 %	Reattività bassa	Positiva
22,62 < % media di deplezione ≤ 42,47 %	Reattività moderata	
42,47 < % media di deplezione ≤ 100 %	Reattività elevata	

⁽¹⁾ Le cifre corrispondono a valori soglia ottenuti per elaborazione statistica e non fanno riferimento alla precisione della misurazione.

⁽²⁾ Una previsione DPRA deve essere presa in considerazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei punti 9 e 12.

Vi possono essere casi in cui la sostanza chimica in esame (la sostanza o uno o più costituenti di una sostanza multi-costituente o una miscela) presenti un'assorbanza significativa a 220 nm e abbia lo stesso tempo di ritenzione del peptide (co-eluzione). La co-eluzione può essere risolta con un adeguamento minimo della configurazione HPLC per separare ulteriormente il tempo di eluzione della sostanza chimica in esame e del peptide. Qualora venga utilizzata una configurazione alternativa della HPLC per risolvere il problema della co-eluzione, si deve dimostrarne l'equivalenza con la configurazione convalidata (ad esempio, sottoponendo a prova le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2). In caso di co-eluzione, il picco del peptide non può essere integrato e non è possibile calcolarne il tasso di deplezione. Se la co-eluzione della sostanza chimica in esame si verifica con i peptidi contenenti sia cisteina che lisina, l'analisi viene registrata come "non conclusiva". Nei casi in cui si registra co-eluzione soltanto con il peptide contenente lisina, si può utilizzare il modello predittivo per la cisteina 1:10 di cui alla tabella 2.

Tabella 2

Modello predittivo cisteina 1:10 ⁽¹⁾

Percentuale di deplezione della cisteina	Classe di reattività	Previsione DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ % di deplezione della cisteina ≤ 13,89 %	Reattività nulla o minima	Negativa
13,89 % < di deplezione della cisteina ≤ 23,09 %	Reattività bassa	Positiva
23,09 % < di deplezione della cisteina ≤ 98,24 %	Reattività moderata	
98,24 % < di deplezione della cisteina ≤ 100 %	Reattività elevata	

⁽¹⁾ Le cifre corrispondono a valori soglia ottenuti per elaborazione statistica e non fanno riferimento alla precisione della misurazione.

⁽²⁾ Una previsione DPRA deve essere presa in considerazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei punti 9 e 12.

Vi possono essere altri casi in cui la sovrapposizione del tempo di ritenzione tra la sostanza chimica in esame e uno dei peptidi è incompleta. In questi casi i valori di deplezione del peptide possono essere stimati e utilizzati nel modello predittivo cisteina 1:10/lisina 1:50, per quanto non sia possibile assegnare con accuratezza la sostanza chimica in esame a una classe di reattività.

Un'unica analisi HPLC per il peptide contenente cisteina e quello contenente lisina dovrebbe essere sufficiente per la sostanza chimica in esame qualora i risultati siano inequivocabili. Tuttavia, qualora i risultati siano prossimi alla soglia utilizzata per stabilire la positività o negatività (ovvero, risultati borderline), possono rendersi necessarie ulteriori prove. Nei casi in cui la percentuale media di deplezione si collochi nella fascia compresa tra il 3 % e il 10 % per il modello predittivo cisteina 1:10/lisina 1:50 o la percentuale di deplezione della cisteina si collochi nella fascia compresa tra il 9 % e il 17 % per il modello predittivo cisteina 1:10, si deve considerare l'eventualità di una seconda analisi o di una terza in caso di risultati discordanti tra le prime due.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame

— Sostanza mono-costituente:

— identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale e/o altri identificativi;

- apparenza fisica, idrosolubilità, peso molecolare, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;
 - purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e praticabile;
 - trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);
 - concentrazioni saggiate;
 - condizioni di stoccaggio e stabilità, secondo la disponibilità.
- Sostanza multi-costituente, UVCB e miscela:
- caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio mediante identità chimica (vedi sopra), purezza, proporzioni quantitative e pertinenti proprietà fisico-chimiche (vedi sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;
 - apparenza fisica, idrosolubilità, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;
 - peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;
 - trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);
 - concentrazioni saggiate;
 - condizioni di stoccaggio e stabilità, secondo la disponibilità.

Controlli

- Controllo positivo:
 - identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale e/o altri identificativi;
 - apparenza fisica, idrosolubilità, peso molecolare, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;
 - purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e praticabile;
 - trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);
 - concentrazioni saggiate;
 - condizioni di stoccaggio e stabilità, secondo la disponibilità;
 - riferimento ai dati storici del controllo positivo che evidenzino criteri di accettabilità adeguati per la sequenza, se pertinente.
- Solvente/mezzo disperdente:
 - solvente/mezzo disperdente utilizzato e percentuale dei suoi costituenti, se del caso;
 - identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS e/o altri identificativi;
 - purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e praticabile;
 - apparenza fisica, peso molecolare, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli menzionati nel metodo di prova e se disponibili;
 - condizioni di stoccaggio e stabilità, secondo la disponibilità;

- giustificazione della scelta del solvente per ciascuna sostanza chimica in esame;
- per l'acetonitrile, risultati della prova d'impatto sulla stabilità dei peptidi.

Preparazione dei peptidi, del controllo positivo e della sostanza chimica in esame

- Caratterizzazione delle soluzioni peptidiche (fornitore, lotto, peso esatto del peptide, volume aggiunto per preparare la soluzione madre);
- caratterizzazione della soluzione per il controllo positivo (peso esatto della sostanza del controllo positivo, volume aggiunto per preparare la soluzione di prova);
- caratterizzazione delle soluzioni per la sostanza chimica in esame (peso esatto della sostanza chimica in esame, volume aggiunto per preparare la soluzione di prova).

Configurazione e analisi HPLC

- Tipo di strumentazione HPLC, colonna HPLC e colonna di protezione, rivelatore, dispensatore automatico;
- parametri pertinenti per l'analisi HPLC, quali temperatura della colonna, volumi iniettati, portata e gradiente.

Adeguatezza del sistema

- Area di picco dei peptidi a 220 nm per ciascuna replica dello standard e del controllo di riferimento A;
- rappresentazione grafica della curva lineare di taratura e indicazione del suo coefficiente r^2 ;
- concentrazione dei peptidi di ciascuna replica del controllo di riferimento A;
- concentrazione peptidica media (mM) dei tre controlli di riferimento A, deviazione standard e coefficiente di variazione;
- concentrazione peptidica media dei controlli di riferimento A e C.

Sequenza di analisi

- Per i controlli di riferimento:
 - area di picco dei peptidi a 220 nm per ciascuna replica A e C;
 - area media di picco dei peptidi a 220 nm dei nove controlli di riferimento B e C in acetonitrile, deviazione standard e coefficiente di variazione (verifica della stabilità dei controlli di riferimento per tutta la durata dell'analisi);
 - per ciascun solvente utilizzato, area media di picco dei peptidi a 220 nm dei tre controlli di riferimento C appropriati (per il calcolo del tasso di deplezione dei peptidi);
 - per ciascun solvente utilizzato, concentrazione dei peptidi (mM) dei tre controlli di riferimento C appropriati;
 - per ciascun solvente utilizzato, concentrazione media dei peptidi (mM) dei tre controlli di riferimento C, deviazione standard e coefficiente di variazione appropriati.
- Per i controlli positivi:
 - area di picco dei peptidi a 220 nm per ciascuna replica;
 - tasso percentuale di deplezione dei peptidi di ciascuna replica;
 - percentuale media di deplezione dei peptidi delle tre repliche, deviazione standard e coefficiente di variazione.
- Per ciascuna sostanza chimica in esame:
 - presenza di precipitato nella miscela di reazione alla fine del periodo di incubazione, se osservata. Indicare se il precipitato è stato risolubilizzato o centrifugato;

- presenza di co-eluzione;
- descrizione di eventuali altre osservazioni, se pertinente;
- area di picco dei peptidi a 220 nm per ciascuna replica;
- tasso percentuale di deplezione dei peptidi di ciascuna replica;
- percentuale media di deplezione dei peptidi delle tre repliche, deviazione standard e coefficiente di variazione;
- valori del tasso medio di deplezione della cisteina e della lisina;
- modello predittivo utilizzato e previsione DPRA.

Controllo della competenza

- Se del caso, la procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'applicazione del metodo di prova (ad esempio sottoponendo a prova le sostanze di riferimento) o nel dimostrare la riproducibilità nel tempo del metodo di prova.

Discussione dei risultati

- Discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova DPRA;
- discussione dei risultati del metodo di prova nel contesto di un approccio IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) Capitolo B.6 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea.
- (4) Capitolo B.42 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea: saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*)
- (5) Capitolo B.50 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea: saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*): DA.
- (6) Capitolo B.51 del presente allegato, Sensibilizzazione cutanea: saggio LLNA (*Local Lymph Node Assay*): BrU-ELISA.
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
 - (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609-618.
 - (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
 - (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
 - (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
 - (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
 - (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
 - (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
 - (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
 - (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
 - (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf -138
 - (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e uno degli aspetti della sua "pertinenza". Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" a indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (21).

AOP (*Adverse Outcome Pathway* — **meccanismo d'azione degli eventi avversi):** sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso in vivo (2).

Curva di taratura: relazione tra il valore della risposta sperimentale e la concentrazione analitica (detta anche *curva standard*) di una sostanza nota.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Coefficiente di variazione: misura della variabilità calcolata per una serie di dati ottenuti dalle repliche dividendo la deviazione standard per la media. Tale misura può essere moltiplicata per 100 per ottenere una percentuale.

Pericolo: proprietà intrinseca di un agente o di una situazione in grado di causare effetti nocivi se un organismo, un sistema o una (sotto-)popolazione vi sono esposti.

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* — **Approccio integrato di prova e valutazione):** approccio strutturato utilizzato per l'individuazione del rischio (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o per la valutazione di sicurezza (potenziale/potenza e esposizione) di una sostanza o gruppo di sostanze chimiche che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

Evento molecolare scatenante: perturbazione, chimicamente indotta, di un sistema biologico a livello molecolare individuata come l'evento scatenante nell'azione dell'effetto avverso (AOP).

Miscela: una miscela o una soluzione composta da due o più sostanze che non interagiscono tra di loro (1).

Sostanza mono-costituente: sostanza, definita dalla sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente almeno all'80 % (p/p).

Sostanza multi-costituente: sostanza, definita dalla sua composizione quantitativa, in cui più di un costituente principale è presente in una concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multi-costituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra una miscela e una sostanza multi-costituente è data dal fatto che la miscela è ottenuta miscelando due o più sostanze senza che vi sia reazione chimica. Una sostanza multi-costituente è il risultato di una reazione chimica.

Controllo positivo: replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che è trattata con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. Per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo, la portata della reazione positiva non dovrebbe essere eccessiva.

Controllo di riferimento: un campione non trattato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova, compreso il solvente e il mezzo disperdente usati con la sostanza chimica in esame e gli altri campioni di controllo al fine di stabilire la reazione di base nei campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta nello stesso solvente o mezzo disperdente. Nelle prove con controlli negativi paralleli, questo campione dimostra anche se il solvente o mezzo disperdente è in grado di interagire con il sistema di prova.

Pertinenza: descrizione della relazione tra la prova e l'effetto di interesse e indicazione del fatto che la prova sia o meno significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (21).

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 interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (21).

Riproducibilità: concordanza tra i risultati ottenuti saggiando la stessa sostanza chimica in esame in applicazione dello stesso protocollo sperimentale (vedi Affidabilità) (21).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (21).

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (21).

Sostanza: elementi chimici e loro componenti allo stato naturale o ottenuti mediante un processo di produzione, compresi gli additivi necessari a conservare la stabilità del prodotto e le eventuali impurità derivanti dal processo utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza ripercussioni sulla stabilità della sostanza o modifiche della sua composizione (1).

Adeguatezza del sistema: determinazione dell'efficacia degli strumenti (ad esempio, sensibilità) mediante l'analisi di uno standard di riferimento prima di sottoporre a prova il lotto analitico (22).

Sostanza chimica in esame: il termine "sostanza chimica in esame" designa la sostanza oggetto della prova.

Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (GHS dell'ONU): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi 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).

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

Metodo di prova valido: un metodo di prova che si ritiene abbia sufficiente pertinenza e affidabilità per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in termini assoluti ma soltanto in relazione a un obiettivo definito (21).

Appendice 2

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Sensibilizzazione cutanea in chimico: saggio di reattività peptidica diretta

Prima di utilizzare sistematicamente il presente metodo di prova, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo correttamente la predizione attesa con il metodo DPRA per le 10 sostanze di riferimento raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori di deplezione della cisteina e della lisina che si collochino nei rispettivi intervalli di riferimento per 8 delle 10 sostanze di riferimento per ciascun peptide. Le sostanze di riferimento di cui trattasi sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte in caso di rischio di sensibilizzazione cutanea. Altri criteri di selezione erano la disponibilità in commercio delle sostanze, la qualità elevata dei dati di riferimento in vivo disponibili, la qualità elevata dei dati in vitro ottenuti con il DPRA e il loro utilizzo nello studio di convalida coordinato dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (EURL ECVAM) per dimostrare che il metodo di prova è stato attuato con successo dai laboratori partecipanti allo studio.

Tabella 1

Sostanze di riferimento raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il saggio di reattività peptidica diretta (DPRA).

Sostanze di riferimento	N. CAS	Stato fisico	Previsione in vivo ⁽¹⁾	Previsione DPRA ⁽²⁾	Intervallo di variazione ⁽³⁾ della % di deplezione del peptide con cisteina	Intervallo di variazione ⁽³⁾ della % di deplezione del peptide con lisina
2,4-dinitroclorobenzene	97-00-7	Solido	Sensibilizzante (estremamente elevato)	Positiva	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	Solido	Sensibilizzante (estremamente elevato)	Positiva	60-80	10-55
Formaldeide	50-00-0	Liquido	Sensibilizzante (elevato)	Positiva	30-60	0-24
Benzilidenacetone	122-57-6	Solido	Sensibilizzante (moderato)	Positiva	80-100	0-7
Farnesale	19317-11-4	Liquido	Sensibilizzante (debole)	Positiva	15-55	0-25
2,3-butandione	431-03-8	Liquido	Sensibilizzante (debole)	Positiva	60-100	10-45
1-butanololo	71-36-3	Liquido	Non sensibilizzante	Negativa	0-7	0-5,5
6-metilcumarina	92-48-8	Solido	Non sensibilizzante	Negativa	0-7	0-5,5

Sostanze di riferimento	N. CAS	Stato fisico	Previsione <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Previsione DPRA ⁽²⁾	Intervallo di variazione ⁽³⁾ della % di deplezione del peptide con cisteina	Intervallo di variazione ⁽³⁾ della % di deplezione del peptide con lisina
Acido lattico	50-21-5	Liquido	Non sensibilizzante	Negativa	0-7	0-5,5
4-metossiacetofenone	100-06-1	Solido	Non sensibilizzante	Negativa	0-7	0-5,5

⁽¹⁾ Le previsioni *in vivo* del pericolo (e la potenza sensibilizzante) sono basate su dati LLNA (19). La potenza *in vivo* è determinata utilizzando i criteri proposti da ECETOC (23).

⁽²⁾ Una previsione DPRA deve essere presa in considerazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei punti 9 e 11.

⁽³⁾ Intervalli determinati sulla base di almeno 10 valori di deplezione stabiliti da 6 laboratori indipendenti.

Appendice 3

ESEMPI DI SEQUENZA DI ANALISI

Standard di caratura e controlli di riferimento	Standard 1 Standard 2 Standard 3 Standard 4 Standard 5 Standard 6 Tampone di diluizione Controllo di riferimento A, replica 1 Controllo di riferimento A, replica 2 Controllo di riferimento A, replica 3
Controlli di co-eluzione	Controllo di co-eluzione 1 per la sostanza chimica in esame 1 Controllo di co-eluzione 2 per la sostanza chimica in esame 2
Controlli di riferimento	Controllo di riferimento B, replica 1 Controllo di riferimento B, replica 2 Controllo di riferimento B, replica 3
Prima serie di repliche	Controllo di riferimento C, replica 1 Aldeide cinnamica, replica 1 Campione 1, replica 1 Campione 2, replica 1
Seconda serie di repliche	Controllo di riferimento C, replica 2 Aldeide cinnamica, replica 2 Campione 1, replica 2 Campione 2, replica 2
Terza serie di repliche	Controllo di riferimento C, replica 3 Aldeide cinnamica, replica 3 Campione 1, replica 3 Campione 2, replica 3
Controlli di riferimento	Controllo di riferimento B, replica 4 Controllo di riferimento B, replica 5 Controllo di riferimento B, replica 6

Nella sequenza di analisi devono essere incluse tre serie di controlli di riferimento (ovvero, campioni costituiti soltanto dal peptide disciolto nel solvente appropriato):

Controllo di riferimento A: da utilizzare per verificare l'adeguatezza del sistema HPLC.

Controllo di riferimento B: inserito all'inizio e alla fine della sequenza di analisi per verificare la stabilità dei controlli di riferimento per tutta la durata dell'analisi.

Controllo di riferimento C: incluso nella sequenza di analisi per accertarsi che il solvente utilizzato per dissolvere la sostanza chimica in esame non abbia un impatto sulla percentuale di deplezione del peptide.