

B.61 Metodo di prova di diffusione della fluoresceina per l'individuazione di sostanze corrosive e gravemente irritanti per gli occhi

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 460 (2012). Il metodo di prova di diffusione della fluoresceina (FL) è un metodo di prova in vitro che può essere utilizzato, in determinate circostanze e con specifiche limitazioni, per la classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) come sostanze corrosive e gravemente irritanti per gli occhi, secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (GHS) (categoria 1) delle Nazioni Unite (ONU), del regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (regolamento CLP) ⁽¹⁾ (categoria 1), e dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (EPA) (categoria I) (1) (2). Ai fini del presente metodo di prova, per sostanze gravemente irritanti per gli occhi si intendono le sostanze chimiche che causano danni ai tessuti oculari non reversibili entro 21 giorni in seguito a somministrazione della sostanza chimica in esame o che causano un grave deterioramento della vista; per sostanze corrosive si intendono le sostanze chimiche che causano danni irreversibili ai tessuti oculari. Tali sostanze chimiche sono classificate come appartenenti alla categoria 1 del sistema GHS dell'ONU e del regolamento CLP e alla categoria I dell'EPA.

Il metodo di prova FL, pur non essendo considerato atto a sostituire completamente la prova in vivo sugli occhi del coniglio, è raccomandato quale parte integrante di una strategia di prove in sequenza per la classificazione e l'etichettatura. Pertanto, il metodo FL è raccomandato come prima fase di un approccio top-down (dall'alto verso il basso) per individuare sostanze corrosive / gravemente irritanti, in particolare per alcuni tipi limitati di sostanze chimiche (ossia le sostanze e miscele solubili in acqua) (3) (4).

Attualmente è generalmente riconosciuto che nel prossimo futuro nessuna singola prova di irritazione oculare in vitro sarà in grado di sostituire la prova oculare in vivo (metodo di prova B.5 (5)) per prevedere tutta la gamma di irritazione per diverse classi chimiche. Tuttavia, combinazioni strategiche di diversi metodi di prova alternativi nell'ambito di una strategia di prova sequenziale potrebbero essere in grado di sostituire la prova oculare in vivo (4). L'approccio top-down (4) è concepito per essere utilizzato allorché, sulla base delle informazioni disponibili, si prevede che una sostanza chimica abbia un elevato potenziale di irritazione.

Sulla base del modello di previsione di cui al paragrafo 35, il metodo di prova FL può rilevare che sostanze chimiche entro un limitato campo di applicabilità siano classificate come corrosive / gravemente irritanti per gli occhi (categoria 1 del sistema GHS dell'ONU; categoria 1 del regolamento CLP; categoria I dell'EPA) senza ulteriori prove. Lo stesso vale per le miscele, anche se non utilizzate nella validazione. Pertanto, il metodo di prova FL può essere usato per determinare il grado di irritazione / corrosività oculare delle sostanze chimiche, applicando la strategia di prova sequenziale di cui al metodo di prova B.5 (5). Tuttavia, una sostanza chimica non ritenuta corrosiva o gravemente irritante con il metodo di prova FL dovrebbe essere sottoposta a prova con uno o più metodi di prova supplementari (in vitro e/o in vivo) capaci di identificare con precisione: i) sostanze chimiche che sono, in vitro, falsi negativi corrosivi / gravi irritanti oculari della prova FL (categoria 1 del sistema GHS dell'ONU; categoria 1 del regolamento CLP; categoria I dell'EPA); ii) sostanze chimiche che non sono classificate per corrosione/irritazione oculare (nessuna categoria del sistema GHS dell'ONU; nessuna categoria del regolamento CLP; categoria IV dell'EPA); e/o iii) sostanze chimiche che hanno caratteristiche irritanti per gli occhi moderate/lievi (categorie 2A e 2B nel sistema GHS dell'ONU; categoria 2 del regolamento CLP; categorie II e III dell'EPA).

Scopo di questo metodo di prova è descrivere le procedure impiegate per valutare il potenziale di corrosione o di grave irritazione oculare di una sostanza chimica in esame sulla base della capacità di tale sostanza di indurre lesioni su un monostrato epiteliale confluyente impermeabile. L'integrità della permeabilità transepiteliale è una funzione importante dell'epitelio situato nella congiuntiva e nella cornea. Tale permeabilità transepiteliale è controllata da diverse giunzioni strette. Si è osservato che l'aumento della permeabilità dell'epitelio della cornea in vivo è correlato al livello di infiammazione e di lesioni superficiali constatato nell'evoluzione dell'irritazione oculare.

Nel metodo di prova FL gli effetti tossici dopo un breve tempo di esposizione alla sostanza chimica in esame sono misurati per l'aumento della permeabilità della fluoresceina sodica attraverso il monostrato epiteliale di cellule renali canine Madin-Darby (MDCK) coltivate su inserti permeabili. La quantità di diffusione della fluoresceina è proporzionale alle lesioni indotte dalle sostanze chimiche alle giunzioni strette, ai desmosomi e alle membrane cellulari e può essere utilizzata per stimare il potenziale di tossicità oculare di una sostanza chimica in esame. L'appendice 1 riporta un diagramma di cellule MDCK coltivate su un inserto di membrana per il metodo di prova FL.

⁽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).

Le definizioni figurano nell'appendice 2.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

Il presente metodo di prova si basa sul protocollo INVITTOX n. 71 (6), valutato in uno studio di validazione internazionale dal Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (ECVAM), in collaborazione con il Comitato di coordinamento interagenzia per la convalida dei metodi alternativi (ICCVAM) statunitense e con il Centro giapponese per la convalida di metodi alternativi (JACVAM).

Il metodo di prova FL non è raccomandato per l'identificazione di sostanze chimiche da classificare come irritanti lievi/moderati o delle sostanze chimiche senza classificazione per l'irritazione oculare (sostanze e miscele) (ossia categoria 2A/2B o senza categoria GHS; categoria 2 o nessuna categoria del regolamento CLP; categoria II/III/IV dell'EPA), come comprovato dallo studio di validazione (3) (7).

Il metodo di prova può essere applicato soltanto alle sostanze chimiche solubili in acqua (sostanze e miscele). Generalmente il metodo di prova FL rileva con precisione il potenziale di irritazione oculare grave delle sostanze chimiche idrosolubili e/o il cui effetto tossico non è influenzato dalla diluizione (7). Per essere classificata come solubile in acqua, in condizioni sperimentali, una sostanza chimica deve essere solubile in soluzione salina bilanciata di Hank (HBSS) sterile, contenente calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM), priva di rosso fenolo, in una concentrazione ≥ 250 mg/ml (una dose sopra la soglia di 100 mg/ml). Tuttavia, se la sostanza chimica in esame è solubile a una concentrazione inferiore a 100 mg/ml ma provoca un'induzione FL del 20 % già a quella concentrazione (vale a dire $FL_{20} < 100$ mg/ml), può essere classificata anche in questo caso come categoria 1 GHS o categoria I dell'EPA.

Le limitazioni individuate per questo metodo di prova escludono dal campo di applicabilità acidi e basi forti, fissativi cellulari e sostanze chimiche ad elevata volatilità. Tali sostanze chimiche comportano meccanismi che non sono misurati dal metodo di prova FL, ad esempio coagulazione estesa, saponificazione o reazioni chimiche specifiche. Altre limitazioni identificate per questo metodo si basano sui risultati della capacità predittiva per sostanze chimiche in esame colorate e viscosi (7). Entrambi questi tipi di sostanze chimiche sono di difficile rimozione dal monostrato dopo il breve periodo di esposizione e si ritiene che la predittività del metodo di prova potrebbe essere migliorata utilizzando un maggior numero di fasi di lavaggio. Sostanze chimiche solide in sospensione liquida hanno tendenza a precipitare, rendendo difficile determinare la concentrazione finale a cui le cellule sono esposte. Quando si escludono dalla banca dati sostanze appartenenti a queste classi chimiche e fisiche si registra un marcato miglioramento dell'accuratezza del metodo di prova FL nei sistemi di classificazione dell'UE, dell'EPA e GHS (7).

In considerazione dell'obiettivo del presente metodo di prova (ossia identificare esclusivamente sostanze corrosive / gravemente irritanti degli occhi), i tassi di falsi negativi (cfr. il paragrafo 13) non sono essenziali perché tali sostanze sono destinate ad essere sottoposte a prove successive adeguatamente validate, in vitro o sui conigli, a seconda delle prescrizioni normative, applicando una strategia di prova sequenziale basata sul peso dell'evidenza disponibile (5) (cfr. anche i paragrafi 3 e 4).

Altre limitazioni identificate del metodo di prova FL si basano sui tassi di falsi negativi e falsi positivi. Quando il metodo è utilizzato come prima tappa nell'ambito di un approccio top-down per identificare sostanze e miscele solubili in acqua che sono corrosive / gravemente irritanti per gli occhi (categoria 1 GHS; categoria 1 del regolamento CLP; categoria I dell'EPA), il tasso di falsi positivi del metodo di prova FL varia fra il 7 % (7/103; GHS delle Nazioni Unite e regolamento CLP) e il 9 % (9/99; EPA) e la percentuale di falsi negativi fra il 54 % (15/28; EPA) e il 56 % (27/48; GHS e regolamento CLP) rispetto ai risultati in vivo. I gruppi chimici che presentano falsi positivi e/o falsi negativi con il metodo di prova FL non sono definiti in questa sede.

Determinate limitazioni tecniche sono specifiche per la coltura cellulare MDCK. Le giunzioni strette che bloccano il passaggio del colorante fluoresceina sodica attraverso il monostrato sono progressivamente sempre più compromesse con l'aumentare del numero di passaggi delle cellule. La formazione incompleta delle giunzioni strette provoca l'aumento di diffusione della fluoresceina nel controllo non trattato. Pertanto, è importante definire un livello di diffusione massima ammissibile nei controlli non trattati (cfr. il paragrafo 38: diffusione dello 0 %). Come per tutte le prove in vitro esiste un potenziale di trasformazione delle cellule nel corso del tempo ed è pertanto indispensabile indicare l'intervallo del numero di passaggi per le prove.

L'attuale campo di applicabilità potrebbe essere maggiore in alcuni casi, ma solo dopo aver analizzato un insieme ampliato di dati di sostanze chimiche in esame sottoposte a prova, acquisito preferibilmente attraverso prove (3). Il presente metodo di prova sarà aggiornato di conseguenza tenendo conto di nuove informazioni e nuovi dati.

Per i laboratori che ricorrono a questo tipo di saggio per la prima volta è consigliabile utilizzare le sostanze chimiche di riferimento indicate nell'appendice 3. I laboratori possono utilizzare tali sostanze chimiche per dimostrare le proprie competenze tecniche nell'esecuzione della prova FL prima di presentare i dati della prova FL a scopi normativi per la classificazione dei rischi.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Il metodo di prova FL è un saggio in vitro basato sulla citotossicità e sulla funzione cellulare, eseguito su un monostrato confluyente di cellule epiteliali tubolari MDCK BC 997 coltivate su inserti semipermeabili e riproduttori lo stato di non proliferazione dell'epitelio della cornea in vivo. La linea cellulare MDCK è ben consolidata e forma giunzioni strette e desmosomi simili a quelli riscontrati sulla parte apicale degli epitelii della congiuntiva e della cornea. Le giunzioni strette e i desmosomi in vivo impediscono ai soluti e ai corpi estranei di penetrare l'epitelio della cornea. La perdita di impermeabilità transepiteliale dovuta a lesioni subite dalle giunzioni strette e dai desmosomi è uno dei primi eventi che si verificano nell'irritazione oculare indotta da sostanze chimiche.

La sostanza chimica in esame è applicata allo strato confluyente di cellule coltivate sul lato apicale dell'inserto. Solitamente si usa una breve esposizione di un minuto per rispecchiare la normale velocità di eliminazione nell'esposizione umana. Un vantaggio del breve periodo di esposizione è che le sostanze e le miscele a base di acqua possono essere analizzate non diluite, se sono facilmente rimovibili dopo il periodo di esposizione. Ciò consente un confronto più diretto dei risultati con gli effetti chimici nell'uomo. La sostanza chimica in esame è poi rimossa e il colorante fluoresceina sodica, non tossico e altamente fluorescente, è aggiunto alla parte apicale del monostrato per 30 minuti. La lesione provocata alle giunzioni strette dalla sostanza chimica in esame è determinata dalla quantità di fluoresceina che attraversa lo strato cellulare entro un periodo di tempo definito.

La quantità di colorante fluoresceina sodica che attraversa il monostrato e l'inserto di membrana per passare a un volume predeterminato di soluzione presente nel pozzetto (in cui si diffonde il colorante fluoresceina sodica) è determinata misurando la concentrazione di fluoresceina nel pozzetto con l'ausilio di uno spettrofluorimetro. La quantità di diffusione della fluoresceina (FL) è calcolata con riferimento alle letture dell'intensità della fluorescenza (FI) in due controlli: un controllo in bianco e un controllo di diffusione massima. La percentuale di diffusione e dunque l'entità della lesione alle giunzioni strette è espressa, relativamente a tali controlli, per ogni concentrazione della sostanza chimica in esame. Successivamente si calcola l' FL_{20} (ossia la concentrazione che provoca il 20 % di FL rispetto al valore registrato per il monostrato confluyente non trattato e per gli inserti senza cellule). Il valore dell' FL_{20} (mg/ml) è utilizzato nel modello predittivo per l'identificazione di sostanze corrosive e gravemente irritanti per gli occhi (cfr. il paragrafo 35).

La capacità di recupero è un aspetto importante del profilo tossicologico di una sostanza chimica in esame valutata anche mediante la prova di irritazione oculare in vivo. Analisi preliminari hanno indicato che i dati di recupero (fino a 72 ore dopo l'esposizione a sostanze chimiche) potrebbero potenzialmente migliorare la capacità predittiva del protocollo INVITTOX n. 71, ma è necessaria una valutazione più approfondita per la quale occorrerebbero altri dati, preferibilmente acquisiti mediante ulteriori prove (6). Il presente metodo di prova sarà aggiornato di conseguenza tenendo conto di nuove informazioni e nuovi dati.

PROCEDURA

Preparazione del monostrato cellulare

Il monostrato di cellule MDCK CB 997 viene preparato utilizzando cellule subconfluenti coltivate in matracci con DMEM/miscela nutriente F12 (1x concentrato con L-glutammina, 15 mM di HEPES, calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM) e 10 % di FCS/FBS inattivati termicamente). È importante che tutti i mezzi/soluzioni utilizzati nel corso della prova FL contengano una concentrazione di calcio tra 1,8 mM (200 mg/l) e 1,0 mM (111 mg/l), per garantire la formazione e l'integrità delle giunzioni strette. Occorre controllare l'intervallo del numero di passaggi cellulari per garantire una formazione regolare e riproducibile delle giunzioni strette. Di preferenza, le cellule dovrebbero situarsi nell'intervallo 3-30 dal congelamento perché in questo intervallo di passaggio le cellule hanno una funzionalità simile, che contribuisce alla riproducibilità dei risultati della prova.

Prima di eseguire il metodo di prova FL, le cellule sono staccate dal matraccio per tripsinizzazione e centrifugate e quindi inoculate in una quantità adeguata negli inserti disposti in piastre a 24 pozzetti (cfr. l'appendice 1). Per l'inoculazione delle cellule si utilizzano inserti di 12 mm di diametro dotati di membrana in esteri di cellulosa misti, di spessore compreso fra 80 e 150 μm e diametro dei pori di 0,45 μm . Nello studio di validazione sono stati utilizzati inserti Millicell-HA da 12 mm. Le caratteristiche del tipo di inserto e di membrana sono importanti perché possono influire sulla crescita cellulare e sui legami chimici. Alcuni tipi di sostanze chimiche possono legarsi alla membrana dell'inserto Millicell-HA, potenzialmente influenzando l'interpretazione dei risultati. In caso di ricorso ad altre membrane, occorre dimostrare l'equivalenza utilizzando le sostanze chimiche di riferimento (cfr. l'appendice 3).

La formazione di legami chimici alla membrana dell'inserto è più frequente per i composti cationici, come il cloruro di benzalconio, che subiscono l'attrazione della carica della membrana (7). Il legame chimico alla membrana può aumentare il periodo di esposizione alla sostanza chimica, portando a una sovrastima del potenziale tossico della sostanza stessa, ma può anche ridurre il volume di diffusione della fluoresceina attraverso l'inserto, legando il colorante al composto cationico legato alla membrana dell'inserto e portare così a una sottostima della tossicità. Ciò può essere facilmente controllato esponendo la sola membrana alla concentrazione più alta della sostanza chimica in esame e aggiungendo poi il colorante fluoresceina sodica alla concentrazione normale per il tempo di esposizione standard (senza controllo cellulare). Se si forma il legame con il colorante fluoresceina sodica, la membrana dell'inserto assume colorazione gialla dopo la rimozione per lavaggio della sostanza chimica in esame. È dunque essenziale conoscere le proprietà leganti della sostanza chimica in esame per poterne interpretare gli effetti sulle cellule.

L'inoculazione delle cellule sugli inserti deve produrre un monostrato confluento al momento dell'esposizione alla sostanza chimica. Occorre aggiungere $1,6 \times 10^5$ cellule a ogni inserto (400 μl di una sospensione cellulare con una densità di 4×10^5 cellule/ml). In queste condizioni, si ottiene generalmente un monostrato confluento dopo 96 ore di coltura. Occorre esaminare visivamente gli inserti prima dell'inoculazione, per assicurare che qualsiasi lesione registrata dal controllo visivo di cui al paragrafo 30 sia dovuta alla manipolazione.

Le colture cellulari MDCK vanno conservate in incubatrici in atmosfera umidificata, a $5(\pm 1) \%$ di CO_2 e $37(\pm 1)^\circ\text{C}$. Le cellule non devono essere contaminate da batteri, virus, micoplasmi o funghi.

Applicazione delle sostanze chimiche di prova e di controllo

Occorre preparare una nuova soluzione madre della sostanza chimica in esame per ciascuna esecuzione dell'esperimento, da utilizzare entro 30 minuti dalla preparazione. Le sostanze chimiche in esame devono essere preparate in HBBS contenente calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM), priva di rosso fenolo, per evitare la formazione di legami con le proteine seriche. Prima della prova occorre valutare la solubilità della sostanza chimica a 250 mg/ml in HBSS. Se a questa concentrazione la sostanza chimica forma una sospensione stabile o un'emulsione (ossia rimane uniforme e non si decanta né si separa in più fasi) per 30 minuti, l'HBBS può ancora essere utilizzata come solvente. Tuttavia, se la sostanza chimica risulta insolubile in HBSS a questa concentrazione, occorre prendere in considerazione l'uso di altri metodi di prova diversi dal metodo FL. L'uso di olio minerale come solvente, nei casi in cui la sostanza chimica sia risultata insolubile in HBSS, andrebbe considerato con cautela in quanto i dati disponibili non sono sufficienti per stabilire l'efficacia della prova FL in tali condizioni.

Tutte le sostanze chimiche da sottoporre a prova sono preparate in HBBS sterile contenente calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM), priva di rosso fenolo, a partire dalla soluzione madre, a cinque concentrazioni fisse diluite in peso/volume: 1, 25, 100, 250 mg/ml e una soluzione pura o satura. Durante la prova di una sostanza chimica solida, occorre includere una concentrazione molto elevata di 750 mg/ml. Tale concentrazione della sostanza chimica può dover essere applicata alle cellule utilizzando una pipetta a spostamento positivo. Se si rileva tossicità tra 25 e 100 mg/ml, occorre testare due volte le ulteriori concentrazioni successive: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Il valore dell' FL_{20} deve essere ricavato da tali concentrazioni, a condizione che siano stati soddisfatti i criteri di accettazione.

Le sostanze chimiche in esame vengono applicate ai monostrati cellulari confluenti dopo la rimozione del terreno di coltura cellulare e due lavaggi con HBBS sterile, calda (37 °C), contenente calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM) e priva di rosso fenolo. In precedenza, i filtri sono stati sottoposti a ispezione visiva per rilevare eventuali danni preesistenti che potrebbero essere erroneamente attribuite a potenziali incompatibilità con le sostanze chimiche in esame. Occorre utilizzare almeno tre repliche per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame e per i controlli in ciascuna esecuzione della prova. Dopo un minuto di esposizione a temperatura ambiente, la sostanza chimica in esame deve essere rimossa con cura per aspirazione, il monostrato lavato due volte con HBBS sterile, calda (37 °C), contenente calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM) e priva di rosso fenolo e la diffusione della fluoresceina misurata immediatamente.

Controlli negativi (NC) e positivi (PC) sono allestiti in parallelo in ciascuna esecuzione della prova per dimostrare che l'integrità del monostrato (NC) e la sensibilità delle cellule (PC) rientrano in un definito intervallo storico di accettabilità. La sostanza consigliata per il controllo positivo è il Brij 35 (n. CAS 9002-92-0) a 100 mg/ml. A tale concentrazione dovrebbe corrispondere una diffusione della fluoresceina approssimativa del 30 % (intervallo accettabile del 20-40 % di diffusione della fluoresceina, ossia di danni allo strato cellulare). La sostanza consigliata per il controllo negativo è HBBS contenente calcio (a una concentrazione di 1,0-1,8 mM), priva di rosso fenolo (controllo in bianco non trattato). Occorre includere in ciascuna serie di prove anche un controllo della diffusione massima, per consentire il calcolo dei valori dell'FL₂₀. La diffusione massima si determina utilizzando un inserto di controllo senza cellule.

Determinazione della permeabilità alla fluoresceina

Immediatamente dopo la rimozione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo, si aggiungono agli inserti 400 µl di soluzione di fluoresceina sodica (0,01 % (peso/volume) in HBBS contenente calcio [a una concentrazione di 1,0-1,8 mM] e priva di rosso fenolo) (ad esempio Millicell-HA). Le colture sono mantenute per 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione con fluoresceina, gli inserti sono accuratamente rimossi da ciascun pozzetto. Si effettua un controllo visivo su ciascun filtro e si registrano eventuali danni verificatisi durante la manipolazione.

La quantità di fluoresceina diffusa attraverso il monostrato e l'inserto è quantificata nella soluzione rimasta nei pozzetti dopo la rimozione degli inserti. Le misurazioni sono effettuate in uno spettrofluorimetro a lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione di 485 nm e 530 nm, rispettivamente. Occorre regolare la sensibilità dello spettrofluorimetro in modo da ottenere la massima differenza numerica tra l'FL massima (inserto senza cellule) e l'FL minima (inserto con monostrato confluyente trattato con il controllo negativo). A causa delle differenze fra gli spettrofluorimetri utilizzati, si suggerisce una sensibilità tale da provocare un'intensità della fluorescenza > 4 000 al controllo della diffusione massima di fluoresceina. Il valore massimo dell'FL non deve essere superiore a 9 999. La massima intensità di diffusione di fluorescenza deve rientrare nell'intervallo lineare dello spettrofluorimetro utilizzato.

Interpretazione dei risultati e modello predittivo

L'entità dell'FL è proporzionale alle lesioni indotte dalle sostanze chimiche alle giunzioni strette. La percentuale di FL per ciascuna concentrazione testata della sostanza chimica è calcolata a partire dai valori di FL ottenuti per la sostanza chimica in esame con riferimento ai valori FL del controllo negativo (lettura del monostrato confluyente di cellule trattate con il controllo negativo) e un controllo della diffusione massima (lettura per l'entità dell'FL attraverso un inserto senza cellule).

Intensità media della fluorescenza corrispondente alla diffusione massima = x

Intensità media della fluorescenza corrispondente alla diffusione dello 0 % = y

La media della diffusione del 100 % si ottiene sottraendo la diffusione dello 0 % media dalla diffusione massima media,

vale a dire $x - y = z$

La diffusione percentuale per ciascuna dose fissa si ottiene sottraendo la diffusione dello 0 % dall'intensità media della fluorescenza rilevata nelle tre repliche (m) e dividendo tale valore per la diffusione al 100 %, vale a dire %FL = [(m-y) / z] x 100 %, ove:

m = l'intensità media della fluorescenza rilevata nelle tre repliche per la concentrazione interessata

%FL = la percentuale di fluoresceina diffusa attraverso lo strato cellulare

Si applica la seguente equazione per il calcolo della concentrazione chimica che provoca una FL del 20 %:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

ove:

D = % dell'inibizione

A = % delle lesioni (diffusione della fluoresceina del 20 %)

B = % di diffusione della fluoresceina < A

C = % di diffusione della fluoresceina > A

M_C = concentrazione (mg/ml) di C

M_B = concentrazione (mg/ml) di B

Il valore soglia dell'FL₂₀ che consente di prevedere se le sostanze chimiche sono corrosive / gravemente irritanti per gli occhi è riportato di seguito:

FL ₂₀ (mg/ml)	C&E GHS ONU	C&E CLP UE	C&E EPA USA
≤ 100	Categoria 1	Categoria 1	Categoria I

C&E: classificazione ed etichettatura

Il metodo di prova FL è raccomandato esclusivamente per l'individuazione di sostanze solubili in acqua corrosive e gravemente irritanti (categoria 1 del sistema GHS dell'ONU, categoria 1 del regolamento CLP e categoria I dell'EPA) (cfr. i paragrafi 1 e 10).

Al fine di individuare le sostanze chimiche solubili in acqua (sostanze e miscele) (3) (6) (7) "causanti gravi lesioni oculari" (categoria 1 GHS ONU e categoria 1 del regolamento CLP) o "corrosive o gravemente irritanti per gli occhi" (categoria I dell'EPA USA), la sostanza chimica in esame deve indurre un valore di FL₂₀ ≤ 100 mg/ml.

Accettazione dei risultati

Il valore medio della diffusione massima di fluoresceina (x) deve essere superiore a 4 000 (cfr. il paragrafo 31), la media della diffusione dello 0 % (y) deve essere pari o inferiore a 300 e la media della diffusione del 100 % (z) deve essere compresa tra 3 700 e 6 000.

Una prova si ritiene accettabile se il controllo positivo ha causato lesioni che interessano dal 20 % al 40 % dello strato cellulare (da misurare come % di diffusione della fluoresceina).

DATI E RELAZIONE

Dati

Per ciascuna serie, i dati ottenuti dai pozzetti di ciascuna replica (ad esempio i valori dell'intensità della fluorescenza e le percentuali di FL calcolate per ogni sostanza chimica in esame, compresa la relativa classificazione) sono presentati in forma di tabella. Inoltre, occorre riferire i valori medi ± deviazione standard delle misurazioni corrispondenti a ciascuna replica per ciascuna serie di prove.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanze chimiche in esame e sostanze di controllo

- Denominazioni chimiche, quali le denominazioni strutturali CAS (Chemical Abstracts Service) seguite da altri nomi, se conosciuti;
- numero CAS della sostanza chimica, se noto;
- purezza e composizione della sostanza o della miscela (in percentuale ponderale), nella misura in cui l'informazione è disponibile;
- proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio (per esempio natura fisica, volatilità, pH, stabilità, solubilità in acqua, classe chimica);
- trattamento delle sostanze chimiche in esame / sostanze di controllo prima del test, se del caso (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);
- condizioni di conservazione.

Giustificazione del metodo di prova e del protocollo utilizzato

- Considerazioni in materia di campo di applicabilità e limitazioni del metodo di prova.

Condizioni di prova

- Descrizione del sistema cellulare utilizzato, compreso il certificato di autenticità e la situazione micoplasmica della linea cellulare;
- dettagli della procedura di prova adottata;
- concentrazione/i della sostanza chimica in esame utilizzate;
- durata dell'esposizione alla sostanza chimica in esame;
- durata dell'incubazione con fluoresceina;
- descrizione di qualsiasi modifica del protocollo sperimentale;
- descrizione dei criteri di valutazione impiegati;
- riferimenti ai dati storici del modello (ad esempio controlli negativi e positivi, sostanze chimiche di riferimento, se del caso);
- informazioni sulla competenza tecnica dimostrata dal laboratorio.

Risultati

- Presentazione sotto forma di tabella dei dati per ciascuna sostanza chimica in esame, ciascun controllo, ciascuna serie e ciascuna replica (inclusi i singoli risultati, le medie e le deviazioni standard);
- la risultante classificazione (o classificazioni) con riferimento al modello predittivo e/o ai criteri di decisione utilizzati;
- descrizione di altri effetti osservati.

Discussione dei risultati

- considerazioni relative a un esito non probante (paragrafo 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) e ulteriori prove.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Consultabile al seguente indirizzo: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
 - (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
 - (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based in vitro assays for eye irritation testing.
 - (4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
 - (5) Capitolo B.5 del presente allegato, *Corrosione/irritazione oculare acuta*.
 - (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Consultabile al seguente indirizzo: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>.
 - (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
 - (8) OCSE (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. OCSE, Parigi.
-

Appendice 1

DIAGRAMMA DI CELLULE MDCK COLTIVATE SU UN INSERTO DI MEMBRANA PER IL METODO DI PROVA FL

Si coltiva uno strato confluyente di cellule MDCK sulla membrana semipermeabile di un inserto. Gli inserti sono disposti nei pozzetti di piastre a 24 pozzetti.

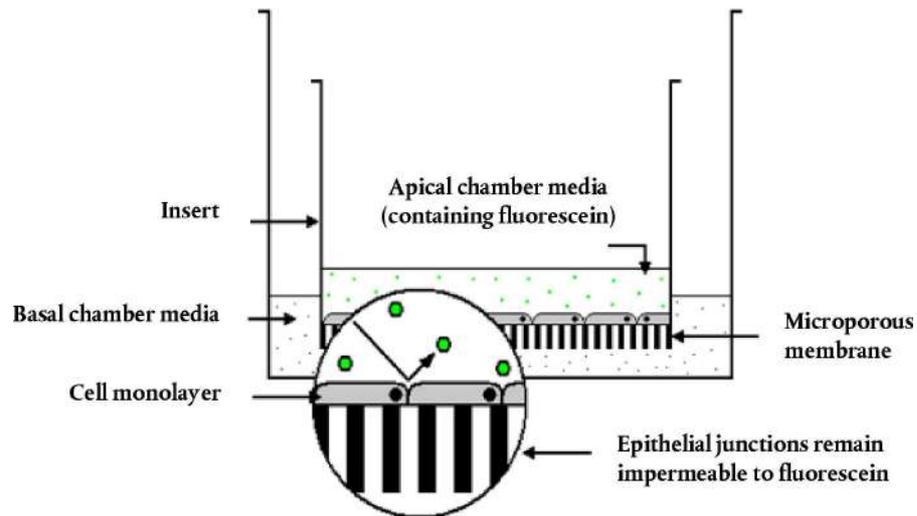


Figura tratta da: Wilkinson, P.J. (2006), *Development of an in vitro model to investigate repeat ocular exposure*, Ph.D. Tesi, Università di Nottingham, Regno Unito.

Appendice 2

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo e i valori di riferimento comunemente accettati. È una misura dell'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della "pertinenza". Questo termine è spesso utilizzato in modo equivalente a "concordanza", a significare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Categoria I dell'EPA: sostanze ad effetto corrosivo (distruzione irreversibile del tessuto oculare) o che producono interessamento o irritazione della cornea persistenti per oltre 21 giorni (2).

Regolamento CLP: (regolamento (CE) n. 1271/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele): attua nell'Unione europea (UE) il sistema GHS dell'ONU per la classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele).

Percentuale di falsi negativi: percentuale di tutte le sostanze chimiche positive falsamente identificate come negative da un metodo di prova. È un indicatore dell'efficienza del metodo di prova.

Percentuale di falsi positivi: percentuale di tutte le sostanze chimiche negative falsamente identificate come positive da un metodo di prova. È un indicatore dell'efficienza del metodo di prova.

FL₂₀: può essere calcolata determinando la concentrazione alla quale la sostanza chimica in esame causa la diffusione del 20 % della fluoresceina attraverso lo strato cellulare.

Diffusione della fluoresceina: quantità di fluoresceina diffusa attraverso lo strato cellulare, misurata mediante spettrofluorometria.

GHS (Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (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.

Categoria 1 del GHS: produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione.

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

Miscela: nel contesto del sistema GHS delle Nazioni Unite, miscela o soluzione composta di due o più sostanze che non interagiscono.

Controllo negativo: una replica non trattata che contiene tutti i componenti di un sistema di prova. Il campione è saggiato con campioni trattati con la sostanza chimica in esame e altri campioni di controllo per determinare se il disperdente interagisce con il sistema di prova.

Senza classificazione: sostanze chimiche non classificate come irritanti oculari di categoria 1, 2A o 2B del sistema GHS dell'ONU; categoria 1 o 2 del regolamento CLP; o categorie I, II o III dell'EPA.

Sostanza corrosiva oculare: a) sostanza chimica che causa danni irreversibili ai tessuti oculari; b) sostanze chimiche classificate come irritanti oculari di categoria 1 del sistema GHS dell'ONU, categoria 1 del regolamento CLP o categoria I dell'EPA.

Irritante oculare: a) sostanza chimica che produce cambiamenti reversibili negli occhi in seguito all'applicazione alla superficie anteriore dell'occhio; b) sostanze chimiche classificate come irritanti oculari di categoria 2A o 2B del sistema GHS dell'ONU, categoria 2 del regolamento CLP o categoria II o III dell'EPA di irritanti per gli occhi.

Grave irritante oculare: a) sostanza chimica che causa danni ai tessuti oculari in seguito all'applicazione sulla superficie anteriore dell'occhio non risolvibili entro 21 giorni dall'applicazione o indebolimento grave della vista; b) sostanze chimiche classificate come irritanti oculari di categoria 1 del sistema GHS dell'ONU, categoria 1 del regolamento CLP; o categoria I dell'EPA.

Controllo positivo: una replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che è trattato con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. L'entità della reazione positiva non dovrebbe essere estrema, per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

Sostanze chimiche per la verifica della competenza: Un sottogruppo dell'elenco di sostanze chimiche di riferimento che può essere utilizzato da un laboratorio per dimostrare la competenza ad eseguire il metodo di prova di riferimento validato che non è mai stato utilizzato dal medesimo laboratorio.

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 (8).

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.

Prova di sostituzione: una prova progettata per sostituire un saggio usato correntemente e accettato per l'individuazione dei pericoli e/o la valutazione dei rischi, e che è stata determinata per fornire una protezione equivalente o maggiore della salute dell'uomo o degli animali oppure dell'ambiente, se del caso, rispetto alla prova accettata, per tutte le possibili situazioni sperimentali e le sostanze di prova.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo (8).

Gravi lesioni oculari: produzione di danni ai tessuti oculari o di indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato che contiene tutti i componenti di un sistema di prova, compreso il solvente e il mezzo disperdente (veicolo) usato con la sostanza chimica in esame saggiato con 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 disperdente. Nelle prove con controlli negativi paralleli, questo campione dimostra anche se il disperdente può interagire con il sistema di prova.

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

Sostanza: nel contesto del sistema GHS dell'ONU, elementi chimici e relativi composti, allo stato naturale o ottenuti mediante qualsiasi procedimento di produzione, compresi gli additivi necessari per preservare la stabilità del prodotto e le impurità derivanti dal procedimento impiegato, ed esclusi i solventi che possono essere separati senza incidere sulla stabilità della sostanza né modificarne la composizione.

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

Strategia di prova sequenziale: strategia di prove graduali in cui sono riesaminate tutte le informazioni disponibili su una sostanza chimica in esame, secondo un ordine ben specificato, seguendo un approccio basato sul peso dell'evidenza disponibile per ciascuna prova, al fine di stabilire se vi sono informazioni sufficienti per una decisione sulla classificazione del pericolo prima di procedere alla fase successiva. Se è possibile assegnare il potenziale di irritazione di una sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili, non è necessario svolgere prove aggiuntive. Se non è possibile assegnare il potenziale di irritazione di una sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili, è svolta una procedura di prova graduale su animali in sequenza fino a che non sia possibile effettuare una classificazione inequivocabile.

Metodo di prova convalidato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di validazione per determinare la pertinenza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova convalidato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato (8).

Peso dell'evidenza: il processo che consiste nel tener conto dei punti di forza e di debolezza di informazioni diverse per conseguire e supportare una data conclusione relativa al potenziale di pericolo di una sostanza chimica in esame.

Appendice 3

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA NEL METODO DI PROVA FL

Prima di utilizzare regolarmente il presente metodo di prova, i laboratori devono dimostrare di possedere la necessaria competenza tecnica identificando correttamente la classificazione di corrosività oculare delle 8 sostanze chimiche raccomandate nella tabella 1. Tali sostanze chimiche sono state selezionate quali rappresentative di una serie di reazioni locali di irritazione/corrosione degli occhi, sulla base di risultati del saggio sugli occhi del coniglio in vivo (TG 405, TM B.5 (5)) (ovvero, categorie 1, 2A, 2B o senza classificazione per il sistema GHS dell'ONU). Tuttavia, in considerazione dell'utilità validata della prova FL (che consiste nell'identificare esclusivamente corrosivi/gravi irritanti oculari) esistono solo due risultati di prova ai fini di una classificazione (corrosivo/gravemente irritante o non corrosivo/non gravemente irritante) per dimostrare la competenza. Gli altri criteri di selezione comprendevano la disponibilità delle sostanze chimiche sul mercato, la presenza di dati di qualità che fungono da riferimento per gli studi in vivo, nonché di dati di qualità di riferimento concernenti il metodo di prova FL. Per questo motivo, le sostanze chimiche per la verifica della competenza sono tratte dal documento *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8), che è stato utilizzato per la validazione del metodo di prova FL.

Tabella 1

Sostanze chimiche raccomandate per la verifica della competenza tecnica per il metodo FL

Sostanza chimica	N. CAS	Classe chimica ⁽¹⁾	Stato fisico	Classificazione in vivo ⁽²⁾	Classificazione in vitro ⁽³⁾
Cloruro di benzalconio (5 %)	8001-54-5	Composto ionico	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Prometazina, cloridrato	58-33-3	Ammina/ammidina, eterociclica, composto organico dello zolfo	Solido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Idrossido di sodio (10 %)	1310-73-2	Alcali	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
Laurilsolfato di sodio (15 %)	151-21-3	Acido carbossilico (sale)	Liquido	Categoria 1	Corrosivo/Gravemente irritante
4-carbossibenaldeide	619-66-9	Acido carbossilico, aldeide	Solido	Categoria 2(A)	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Nitrato ammonico	6484-52-2	Sale inorganico	Solido	Categoria 2(A)	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Etil 2-metilacetato	609-14-3	Chetone, estere	Liquido	Categoria 2(B)	Non corrosivo/Non gravemente irritante
Glicerolo	56-81-5	Alcol	Liquido	Senza categoria	Non corrosivo/Non gravemente irritante

Abbreviazioni: N. CAS = numero del registro CAS (Chemicals Abstract Service Registry).

⁽¹⁾ Ciascuna sostanza chimica in esame è stata assegnata a classi chimiche definite in base a un sistema di classificazione standard, basato sul sistema di classificazione della *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) (disponibile sul sito <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Basata sui risultati della prova sugli occhi dei conigli in vivo (OECD TG 405), sul sistema di classificazione GHS dell'ONU e sul regolamento CLP.

⁽³⁾ Basata sui risultati FL (protocollo INVITTOX n. 71 (6)).