

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 488 (2013). I metodi di prova dell'UE sono disponibili per tutta una serie di saggi di mutagenesi in vitro che consentono di individuare le mutazioni cromosomiche e/o geniche. Alcuni metodi di prova consentono di valutare gli endpoint in vivo (vale a dire le aberrazioni cromosomiche e la sintesi non programmata del DNA), ma non misurano le mutazioni geniche. I saggi di mutagenesi nei roditori transgenici (RTG) rispondono all'esigenza di condurre saggi di mutagenesi in vivo che siano pratici e ampiamente disponibili.
2. I saggi di mutagenesi in RTG sono stati sottoposti ad un esame approfondito (24) (33). Tali saggi sono condotti su ratti e topi transgenici che contengono copie multiple di vettori bifunzionali di plasmidi o fagi integrati nei cromosomi. I transgeni contengono geni reporter per l'individuazione di vari tipi di mutazioni indotte in vivo dalle sostanze in esame.
3. Le mutazioni che si manifestano in un roditore sono quantificate mediante il recupero del transgene e l'analisi del fenotipo del gene reporter in un ospite batterico privo del gene reporter. I saggi di mutagenesi in RTG consentono di misurare le mutazioni indotte in geni geneticamente neutri presenti praticamente in qualsiasi tessuto del roditore. Tali saggi consentono pertanto di superare molte delle limitazioni che attualmente ostacolano lo studio della mutazione genica in vivo in geni endogeni (ad esempio, la limitata quantità di tessuti adatti all'analisi, la selezione positiva/negativa rispetto alle mutazioni).
4. I dati disponibili indicano che i transgeni rispondono ai mutageni in modo analogo ai geni endogeni, soprattutto per quanto riguarda l'individuazione della sostituzione di una coppia di basi, le mutazioni per spostamento del sistema di lettura e le piccole delezioni e inserzioni (24).
5. Gli workshop internazionali sui saggi di genotossicità (IWGT) hanno approvato l'inclusione dei saggi di mutagenesi in RTG ai fini dell'individuazione in vivo delle mutazioni geniche ed hanno raccomandato un protocollo di sperimentazione (15) (29). Il presente metodo di prova si basa su tali raccomandazioni. Ulteriori analisi a sostegno dell'applicazione di tale protocollo sono riportate al punto (16).
6. Si prevede che in futuro potrebbe essere possibile combinare i saggi di mutagenesi in RTG con uno studio di tossicità a dosi ripetute (capitolo B.7 del presente allegato). Tuttavia, è necessario ottenere dati a dimostrazione del fatto che la sensibilità dei saggi di mutagenesi in RTG non è influenzata dal periodo di tempo più corto che intercorre tra la fine del periodo di somministrazione e il momento del campionamento. Tale periodo è di un giorno nei saggi di tossicità a dosi ripetute, mentre è di tre giorni nei saggi di mutagenesi in RTG. Sono altresì necessari dati che dimostrino che i risultati del saggio di tossicità a dosi ripetute non sono compromessi dall'utilizzo di un ceppo di roditore transgenico anziché di un ceppo di roditore tradizionale. Non appena saranno disponibili i dati citati, il presente metodo di prova sarà aggiornato.
7. Le definizioni dei termini chiave figurano nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

8. I saggi di mutagenesi in RTG il cui utilizzo nell'ambito del presente metodo di prova è suffragato da un numero di dati sufficienti sono i seguenti: topi batteriofagi *lacZ* (Muta™Mouse); topi plasmidi *lacZ*; topi, ratti *gpt* delta (*gpt* e *Sp1*); topi, ratti *lacI* (Big Blue®), condotti in condizioni normali. Inoltre, il saggio di selezione positiva *cII* può essere utilizzato per valutare le mutazioni nei modelli Big Blue® e Muta™Mouse. Nei modelli di RTG, il parametro utilizzato per valutare la mutagenesi è normalmente la frequenza dei mutanti; tuttavia, un'analisi molecolare delle mutazioni può, se necessario, fornire ulteriori informazioni (cfr. paragrafo 24).
9. Tali saggi di mutagenesi in vivo sui roditori sono particolarmente rilevanti ai fini di valutare il rischio mutageno, in quanto le risposte al saggio dipendono dal metabolismo in vivo, dalla farmacocinetica, dai processi di riparazione del DNA e dalla sintesi translesione del DNA, benché tali parametri possano variare in funzione delle specie, dei tessuti e del tipo di danno subito dal DNA. Un saggio di mutagenesi in vivo è utile per approfondire lo studio dell'effetto mutageno individuato da un sistema in vitro e per dare seguito ai risultati di test che utilizzano altri endpoint in vivo (24). Oltre al fatto di presentare un rapporto di causalità con l'insorgere di tumori, le mutazioni geniche costituiscono un endpoint pertinente per prevedere le patologie non tumorali su base mutagena nei tessuti somatici (12) (13), nonché le patologie trasmesse tramite le cellule germinali.

10. Se è comprovato che la sostanza in esame o il metabolita pertinente non raggiunge nessuno dei tessuti d'interesse, non è opportuno ricorrere al saggio di mutagenesi in RTG.

PRINCIPIO DEL METODO

11. Nei saggi descritti al paragrafo 8, il gene bersaglio è di origine batterica o batteriofaga, e il recupero dal DNA genomico del roditore si effettua mediante introduzione del transgene in un vettore bifunzionale batteriofago λ o plasmide. Questa procedura comporta l'estrazione del DNA genomico dal tessuto di interesse del roditore, il trattamento in vitro del DNA genomico (ossia impaccamento dei vettori λ o ligazione ed elettroporazione dei plasmidi per recuperare il vettore bifunzionale) e la successiva individuazione di mutazioni negli ospiti batterici in condizioni adeguate. I saggi utilizzano transgeni neutri che sono facilmente recuperabili dalla maggior parte dei tessuti.
12. L'esperimento base di mutagenesi in RTG comporta la somministrazione al roditore di una sostanza chimica per un certo periodo. Le sostanze possono essere somministrate con qualsiasi modalità idonea, compreso l'impianto (ad esempio, test di dispositivi medici). L'intero periodo durante il quale l'animale assume la sostanza è chiamato periodo di somministrazione. La somministrazione è generalmente seguita da un periodo, precedente al sacrificio, durante il quale essa è sospesa e le lesioni non riparate del DNA si stabilizzano sotto forma di mutazioni stabili. In letteratura, tale periodo è variamente denominato "periodo di manifestazione", "periodo di stabilizzazione" o "periodo di espressione". Il termine di tale periodo coincide con il periodo di campionamento (15) (29). Dopo il sacrificio dell'animale, il DNA genomico è isolato dal tessuto o dai tessuti di interesse e purificato.
13. I dati relativi ad un unico tessuto per animale, ottenuti mediante impaccamenti/ligazioni multipli sono di norma aggregati, e la frequenza dei mutanti è di norma valutata utilizzando un numero totale di unità formanti placche o unità formanti colonie compreso negli ordini di grandezza 10^5 e 10^8 . Se si ricorre a metodi di selezione positiva, il numero totale delle unità formanti placche è determinato mediante una distinta serie di piastre non selettive.
14. I metodi di selezione positiva sono stati sviluppati per individuare più facilmente le mutazioni sia del gene *gpt* [topi e ratti *gpt* delta o fenotipo *gpt*⁻ (20) (22) (28)] e del gene *lacZ* [Muta™Mouse o topi plasmide *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; mentre le mutazioni del gene *lacI* negli animali Big Blue® sono individuate mediante un metodo non selettivo che consente di identificare i mutanti mediante la generazione di placche colorate (blu). I metodi di selezione positiva sono inoltre applicati per individuare le mutazioni puntiformi del gene *cII* del vettore bifunzionale batteriofago λ [topi o ratti Big Blue®, e Muta™Mouse) (17)] e le mutazioni per delezione nei geni λ *red* e *gam* [selezione Spi⁻ nei topi e ratti *gpt* delta) (21) (22) (28)]. Si ottiene la frequenza dei mutanti dividendo il numero di placche/plasmidi contenenti mutazioni che si trovano nel transgene per il numero totale di placche/plasmidi recuperati nel medesimo campione di DNA. Negli studi sulla mutagenesi in RTG, la frequenza dei mutanti è il parametro di osservazione. Inoltre, una frequenza di mutazioni può essere determinata come frazione delle cellule che contengono mutazioni indipendenti; questo calcolo richiede di correggere l'espansione clonale mediante sequenziamento dei mutanti recuperati (24).
15. Le mutazioni registrate nei saggi di mutazione puntiforme *lacI*, *lacZ*, *cII* e *gpt* consistono essenzialmente in sostituzioni delle coppie di basi, mutazioni per spostamento del sistema di lettura e in piccole inserzioni/delezioni. La proporzione relativa di questi tipi di mutazioni rispetto alle mutazioni spontanee è analoga a quella osservata per il gene endogeno *Hprt*. Si osservano grandi delezioni soltanto con i saggi di selezione Spi⁻ e di plasmidi *lacZ* (24). Le mutazioni d'interesse sono le mutazioni in vivo che si manifestano in topi o ratti. Le mutazioni in vitro e ex vivo, che possono verificarsi al momento del recupero dei batteriofagi/plasmidi, della replicazione e riparazione, sono relativamente rare e possono, in alcuni sistemi, essere specificamente identificate, o escluse dal sistema di selezione positiva/dell'ospite batterico.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione della specie animale

16. Sono attualmente disponibili diversi modelli di topi transgenici per il rilevamento delle mutazioni geniche, e tali sistemi trovano tuttora più ampia applicazione dei modelli che si avvalgono di ratti transgenici. Qualora il ratto fosse evidentemente più indicato, ai fini dello studio, del topo (per esempio quando si studia il meccanismo della carcinogenesi di un tumore constatato solo nei ratti, per stabilire una correlazione con uno studio di tossicità nei ratti o se è noto che il metabolismo dei ratti è più rappresentativo del metabolismo umano), va preso in considerazione il ricorso a modelli di ratti transgenici.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

17. La temperatura dello stabulario deve essere idealmente di 22 °C (\pm 3 °C). Benché l'umidità relativa debba essere almeno del 30 % e, di preferenza non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia della sala, l'obiettivo è di mantenere un'umidità relativa del 50-60 %. La luce è artificiale, con una sequenza quotidiana di 12 ore di luce seguite da 12 ore di buio. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. Gli animali vanno stabulati in piccoli gruppi (massimo cinque) dello stesso sesso se non si prevede alcun comportamento aggressivo. Gli animali possono essere stabulati individualmente se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico.

Preparazione degli animali

18. I giovani esemplari adulti in buona salute e sessualmente maturi (di 8-12 settimane di età all'inizio del trattamento) sono distribuiti a caso nei gruppi di trattamento e di controllo. Gli animali devono essere identificati in modo univoco. Gli animali devono essere acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare il \pm 20 % del peso medio per sesso.

Preparazione delle dosi

19. Le sostanze solide in esame vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Vanno usati preparati freschi della sostanza, salvo qualora i dati sulla stabilità dimostrino che la conservazione è accettabile.

Condizioni sperimentali*Solvente/mezzo disperdente*

20. Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso.

Controlli positivi

21. Di norma devono essere utilizzati in parallelo animali per i controlli positivi. Tuttavia, per i laboratori che hanno dato prova della loro competenza (cfr. paragrafo 23) e che usano sistematicamente i presenti saggi, il DNA di animali trattati in precedenza e usati ai fini di controllo positivo può essere incluso in ciascuno studio per confermare il successo del metodo. È opportuno che detto DNA proveniente da precedenti esperienze sia ottenuto dalla stessa specie e dagli stessi tessuti di interesse, e sia stato conservato correttamente (cfr. paragrafo 36). Quando sono utilizzati controlli positivi in parallelo, non è necessario somministrarli attraverso lo stesso canale usato per la sostanza in esame. Bisognerebbe tuttavia avere la certezza che i controlli positivi inducono mutazioni in uno o più tessuti d'interesse per la sostanza in esame. Le dosi delle sostanze utilizzate come controlli positivi sono selezionate in modo da produrre effetti deboli o moderati che consentano di valutare criticamente le prestazioni e la sensibilità del saggio. Esempi di sostanze usate come controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio figurano nella tabella 1.

Tabella 1

Esempi di sostanze usate come controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio

Sostanza usata per i controlli positivi e numero CAS	Nome EINECS e numero EINECS	Caratteristiche	Tessuto bersaglio della mutazione	
			Ratto	Topo
N-nitroso-N-ethylurea Numero [CAS 759-73-9]	N-nitroso-N-ethylurea [212-072-2]	Mutageno ad azione diretta	Fegato, polmone	Midollo osseo, colon, epitelio del colon intestino, fegato, polmone, milza, rene, cellule granulose dell'ovaio, cellule germinali maschili

Sostanza usata per i controlli positivi e numero CAS	Nome EINECS e numero EINECS	Caratteristiche	Tessuto bersaglio della mutazione	
			Ratto	Topo
Carbammato di etile (uretano) Numero [CAS 51-79-6]	Uretano [200-123-1]	Mutageno, richiede di essere metabolizzato ma produce solo effetti deboli		Midollo osseo, prestomaco, intestino tenue, fegato, polmone, milza
2,4-toluenediammina Numero [CAS 95-80-7]	4-metil-m-fenilendiammina [202-453-1]	Mutageno, richiede di essere metabolizzato, positivo anche nel saggio Spi ⁺	Fegato	Fegato
Benzo[a]pirene Numero [CAS 50 32-8]	Benzo[def]crisene [200-028-5]	Mutageno, richiede di essere metabolizzato	Fegato, omento	Midollo osseo, mammella, colon, prestomaco, stomaco ghiandolare, cuore, fegato, polmone, cellule germinali maschili

Controlli negativi

22. In ogni fase del campionamento devono includere controlli negativi, cui sia somministrato solo il solvente o il mezzo disperdente, senza altre differenze di trattamento. In mancanza di dati storici o pubblicati che dimostrino che il solvente/mezzo disperdente scelto non induce effetti nocivi o mutageni, anche controlli non trattati andrebbero inclusi in ciascuna fase di campionamento per stabilire l'accettabilità del controllo con il mezzo disperdente.

Verifica delle competenze del laboratorio

23. La competenza a svolgere i presenti saggi deve essere stabilita comprovando la capacità di riprodurre i risultati attesi da dati pubblicati (24) riguardanti: 1) la frequenza di mutanti con le sostanze di controllo positivo (comprese risposte deboli), come quelle elencate nella tabella 1, con non mutageni e con controlli del mezzo disperdente; e 2) il recupero dei transgeni dal DNA genomico (ad esempio, efficienza di impaccamento).

Sequenziamento dei mutanti

24. Ai fini regolamentari il sequenziamento del DNA dei mutanti non è obbligatorio, in particolare in caso di risultato nettamente positivo o negativo. Tuttavia, i dati del sequenziamento possono essere utili se si osservano considerevoli variazioni interindividuali. In questi casi, il sequenziamento può servire ad escludere l'ipotesi di jackpot o fenomeni di clonazione, individuando la proporzione dei mutanti unici in uno specifico tessuto. Sequenziare circa 10 mutanti per ciascun tessuto e per animale è sufficiente per determinare se i mutanti clonali contribuiscono alla frequenza dei mutanti; sequenziare fino a 25 mutanti può essere necessario per correggere matematicamente gli aspetti della clonalità nella frequenza dei mutanti. Il sequenziamento dei mutanti può essere preso in considerazione anche nel caso di piccoli incrementi nella frequenza dei mutanti (cioè quando la frequenza è leggermente superiore ai valori dei controlli non trattati). Le differenze nello spettro dei mutanti tra le colonie di mutanti osservate negli animali trattati e non trattati possono sostenere l'ipotesi di un effetto mutageno (29). Inoltre, gli spettri di mutazione possono servire ad elaborare ipotesi meccanicistiche. Se il sequenziamento rientra nel protocollo di studio, è necessario prestare particolare attenzione alla concezione di tali studi, con particolare riferimento al numero di mutanti sequenziati per campione, al fine di ottenere una potenza statistica adeguata a seconda del modello statistico utilizzato (cfr. paragrafo 43).

PROTOCOLLO

Numero e sesso degli animali

25. Si deve stabilire un numero sufficientemente elevato di animali per ottenere la potenza statistica necessaria ad individuare una frequenza dei mutanti almeno raddoppiata. Ciascun gruppo è composto da almeno 5 animali. Se tuttavia la potenza statistica è insufficiente, si utilizza un maggior numero di animali, come necessario. Di norma vanno utilizzati animali maschi. In alcuni casi può essere giustificato fare ricorso esclusivo alle femmine, ad esempio, nei saggi relativi a medicinali destinati ad essere utilizzati in modo specifico da donne, o negli studi in cui si analizza specificamente il metabolismo femminile. In caso di differenze significative tra i sessi in termini di tossicità o metabolismo, dovranno essere utilizzati sia maschi che femmine.

Periodo di somministrazione

26. Considerando che le mutazioni si accumulano ad ogni trattamento, si rende necessario un regime a dosi ripetute, con somministrazioni giornaliere per un periodo di 28 giorni. Questa impostazione è generalmente ritenuta accettabile sia per produrre un accumulo sufficiente di mutazioni da mutageni deboli sia per fornire un tempo di esposizione adeguato per rilevare le mutazioni negli organi a proliferazione lenta. Trattamenti alternativi possono essere adattati per alcune valutazioni, e tali calendari di dosaggio alternativi devono essere scientificamente giustificati nel protocollo. Il periodo di dosaggio non deve essere più breve del tempo necessario per l'induzione completa di tutti gli enzimi coinvolti nel metabolismo e i dosaggi di durata più breve possono richiedere il ricorso a tempi di campionamento multiplo adattati agli organi con diversi tassi di proliferazione. In entrambi i casi, tutte le informazioni disponibili (ad esempio quelle sulla tossicità generale o sul metabolismo e la farmacocinetica) vanno utilizzate quando si tratta di giustificare un protocollo, in particolare se quest'ultimo si discosta dalle raccomandazioni standard sopra descritte. Poiché possono aumentare la sensibilità, i tempi di dosaggio superiori a 8 settimane devono essere spiegati chiaramente e giustificati, in quanto i tempi di trattamento lunghi possono generare un aumento apparente della frequenza di mutanti per espansione clonale (29).

Livelli di dose

27. I livelli di dose devono essere determinati sulla base dei risultati di uno studio di determinazione degli intervalli di dosaggio che misura la tossicità generale, condotto utilizzando la stessa via di esposizione, o sui risultati di studi esistenti sulla tossicità subacuta. Gli animali non transgenici appartenenti al medesimo ceppo di roditori possono essere utilizzati per determinare tali intervalli di dose. Nel saggio principale, per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo (cfr. paragrafo 22) e almeno tre livelli di dose, distribuiti in modo appropriato, eccetto quando è stata utilizzata la dose limite (cfr. paragrafo 28). Il livello di dose massimo è la dose massima tollerata (DMT), che è definita come dose che produce segni di tossicità tali che livelli più elevati, con la stessa posologia, sarebbero presumibilmente letali. Le sostanze con azione biologica specifica, a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) e le sostanze che manifestano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso. I livelli di dose utilizzati sono compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente.

Saggio limite

28. Se gli esperimenti per determinare gli intervalli di dose o i dati disponibili relativi ai ceppi di roditori affini indicano che un trattamento uguale o superiore alla dose limite (cfr. sotto) non produce effetti tossici osservabili, e se non si prevede genotossicità sulla base dei dati relativi alle sostanze chimiche strutturalmente affini, uno studio completo con tre livelli di dose può non essere considerato necessario. Per un periodo di somministrazione di 28 giorni (ossia 28 somministrazioni giornaliere), la dose limite è pari a 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno. Per periodi di somministrazione di durata pari o inferiore a 14 giorni, la dose limite è pari a 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno (i calendari di dosaggio diversi da 28 somministrazioni giornaliere devono essere oggetto di una giustificazione scientifica nel protocollo, cfr. paragrafo 26).

Somministrazione delle dosi

29. La sostanza in esame viene di solito somministrata con sonda gastrica o cannula di intubazione adeguata. In generale, nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Di conseguenza, le altre vie di esposizione (ad esempio, acqua da bere, subcutanea, endovenosa, topica, inalatoria, intratracheale, alimentare o impianto) sono accettabili se possano essere giustificate. Le iniezioni intraperitoneali non sono raccomandate in quanto la cavità intraperitoneale non è una via di esposizione umana fisiologicamente pertinente. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio, ma non deve in ogni caso superare i 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori deve essere giustificato. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

Periodo di campionamento

Cellule somatiche

30. Il periodo di campionamento è una variabile fondamentale in quanto dipende dal periodo necessario affinché le mutazioni siano stabilizzate. Tale periodo è funzione specifica dei tessuti e sembra essere correlato al tempo di rinnovo della popolazione cellulare: il midollo osseo e l'intestino reagiscono rapidamente, mentre il fegato risponde molto più lentamente. Un periodo di 28 giorni di trattamenti consecutivi (come indicato al paragrafo 26)

e un campionamento tre giorni dopo l'ultima somministrazione sembrano un compromesso accettabile per la misurazione delle frequenze dei mutanti nei tessuti sia a rapida che a lenta proliferazione, sebbene in tali condizioni la frequenza massima di mutanti possa non manifestarsi nei tessuti a proliferazione lenta. Se i tessuti a crescita lenta sono di fondamentale importanza, può rivelarsi più indicato un periodo di campionamento di 28 giorni successivo al periodo di somministrazione di 28 giorni (16) (29). In tal caso, il periodo di campionamento di 28 giorni sostituisce il periodo di campionamento di 3 giorni e richiede una giustificazione scientifica.

Cellule germinali

31. I saggi sui RTG risultano particolarmente adatti allo studio dell'induzione di mutazioni geniche nelle cellule germinali maschili (7) (8) (27), per le quali i tempi e la cinetica della spermatogenesi sono stati ben definiti (27). Il basso numero di ovuli disponibili per l'analisi, anche a seguito di superovulazione, e il fatto che non vi sia alcuna sintesi del DNA nell'ovocita impediscono di determinare, mediante saggi transgenici, se le cellule germinali femminili hanno subito una mutazione (31).
32. Il periodo di campionamento per le cellule germinali maschili va scelto in modo che sia campionata la gamma dei tipi di cellule esposte nell'intera fase dello sviluppo delle cellule germinali e in modo che la fase interessata dal campionamento sia stata sufficientemente esposta. La progressione dello sviluppo delle cellule germinali, dalla fase di cellule staminali spermatogoniali alla fase di sperma maturo che raggiunge il vaso deferente/la coda dell'epididimo, dura circa 49 giorni nei topi (36) e circa 70 giorni nei ratti (34) (35). Dopo un periodo di esposizione di 28 giorni, seguito da un periodo di campionamento minimo di tre giorni, lo sperma accumulato e raccolto presso il vaso deferente/la coda dell'epididimo (7) (8) rappresenta una popolazione di cellule la cui esposizione è pressoché avvenuta durante la seconda metà della spermatogenesi, che include il periodo meiotico e postmeiotico, ma non le fasi delle cellule spermatogoniali o staminali. Per un corretto campionamento delle cellule del vaso deferente/della coda dell'epididimo che erano cellule staminali spermatogoniali durante il periodo di esposizione, è necessario un ulteriore periodo di campionamento di minimo 7 settimane (topi) o 10 settimane (ratti) al termine del trattamento.
33. Le cellule espulse dai tubuli seminiferi dopo un regime di 28 + 3 giorni sono composte da una popolazione mista arricchita per tutte le fasi delle cellule germinali in via di sviluppo (7) (8). Il campionamento di tali cellule per l'individuazione di mutazioni geniche non fornisce una valutazione così precisa delle fasi in cui sono indotte le mutazioni delle cellule germinali quanto il campionamento degli spermatozoi del vaso deferente/della coda dell'epididimo (perché le cellule germinali prelevate dai tubuli sono di vari tipi, tra cui sono probabilmente presenti cellule somatiche che contaminano tale popolazione di cellule). Tuttavia, il campionamento delle cellule prelevate dai tubuli seminiferi in aggiunta agli spermatozoi prelevati nel vaso deferente/nella coda dell'epididimo dopo un regime di 28 + 3 giorni di campionamento consentirebbe di includere in certa misura le cellule esposte durante la maggior parte delle fasi di sviluppo delle cellule germinali e sarebbe utile per l'individuazione di alcuni dei mutageni delle cellule germinali.

Osservazioni

34. Le osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Vanno registrate le informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità. Ogni animale viene pesato almeno una volta alla settimana, così come subito dopo essere stato sacrificato. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi prima della fine del periodo di saggio (23).

Raccolta dei tessuti

35. Gli argomenti addotti per motivare la raccolta dei tessuti vanno chiaramente definiti. Dato che è possibile studiare l'induzione di mutazioni praticamente in qualsiasi tessuto, la selezione dei tessuti da raccogliere va fatta in funzione dei motivi che hanno condotto alla realizzazione dello studio e dei dati già esistenti relativi alla mutagenicità, cancerogenicità o tossicità della sostanza in esame. Tra gli elementi importanti da prendere in considerazione vi sono la via di somministrazione (basata sulle probabili vie d'esposizione per gli esseri umani), la distribuzione tissutale prevista e il possibile meccanismo d'azione. In assenza di informazioni di contesto, devono essere raccolti diversi tessuti somatici, in funzione dell'interesse che rappresentano. Si tratterà di tessuti a rapida proliferazione, a crescita lenta e tessuti appartenenti al sito di contatto. Inoltre, gli spermatozoi del vaso deferente/della coda dell'epididimo e le cellule germinali in via di sviluppo prelevate dai tubuli seminiferi (come descritte ai paragrafi 32 e 33) devono essere raccolti e conservati per il caso in cui si rendesse necessario in futuro un'analisi della mutagenicità delle cellule germinali. Gli organi vanno pesati e per gli organi più grandi va prelevata la medesima zona su tutti gli animali.

Stoccaggio di tessuti e DNA

36. I tessuti (o loro omogeneizzati) vanno stoccati ad una temperatura uguale o inferiore a -70°C e utilizzati per l'isolamento del DNA entro 5 anni. Il DNA isolato, conservato refrigerato ad una temperatura di 4°C in una idonea soluzione tampone, va idealmente utilizzato per l'analisi delle mutazioni entro un anno.

Selezione dei tessuti per l'analisi dei mutanti

37. I tessuti vanno selezionati in funzione dei seguenti criteri: 1) la via di somministrazione o il sito di primo contatto (stomaco ghiandolare nel caso di somministrazione per via orale, polmoni nel caso di somministrazione per inalazione o pelle nel caso di somministrazione per via topica); e 2) i parametri farmacocinetici osservati negli studi di tossicità generale, che indicano l'eliminazione, la ritenzione o l'accumulo nei tessuti o gli organi bersaglio per la tossicità. Qualora si conducano studi per dar seguito a studi sulla cancerogenicità, vanno presi in considerazione i tessuti bersaglio per la cancerogenicità. La scelta dei tessuti da analizzare deve ottimizzare l'individuazione delle sostanze che agiscono come mutageni in vitro ad azione diretta, sono metabolizzate rapidamente, sono altamente reagenti o scarsamente assorbite, o per le quali il tessuto bersaglio è determinato in base alla via di somministrazione (6).
38. In assenza di informazioni di contesto, e se si tiene conto del sito di contatto in funzione della via di somministrazione, va valutata la mutagenicità del fegato e di almeno un tessuto a divisione rapida (ad esempio, stomaco ghiandolare, midollo osseo). Nella maggior parte dei casi tali requisiti possono essere soddisfatti dall'analisi di due tessuti accuratamente selezionati, ma in alcuni casi sono necessari tre o più tessuti. Se c'è motivo di particolare preoccupazione riguardo agli effetti sulle cellule germinali, anche a motivo di risposte positive nelle cellule somatiche, devono essere valutate le mutazioni nei tessuti delle cellule germinali.

Metodi di misurazione

39. Metodi standard di laboratorio o pubblicati per l'individuazione di mutanti sono disponibili per i modelli transgenici raccomandati: batteriofago lambda e plasmide *lacZ* (30); topo *lacI* (2) (18); topo *gpt* delta (22); ratto *gpt* delta (28); *cII* (17). Le modifiche devono essere giustificate e corredate di adeguata documentazione. I dati provenienti da impaccamenti multipli possono essere aggregati e utilizzati per raggiungere un numero adeguato di placche o colonie. Tuttavia, la necessità di ricorrere a molte reazioni da impaccamento per raggiungere il numero idoneo di placche può essere un indicatore della qualità scadente del DNA. In questi casi, si deve procedere con maggiore cautela perché i dati potrebbero essere inaffidabili. Il numero ottimale di placche o di colonie per campione di DNA dipende dalla probabilità statistica di individuare mutanti in numero sufficiente ad una determinata frequenza di mutazioni spontanee. In generale, è necessario un minimo di 125 000-300 000 placche se la frequenza delle mutazioni spontanee è nell'ordine di circa 3×10^{-5} (15). Per il saggio *lacI* Big Blue® occorre altresì dimostrare che l'intera gamma dei fenotipi mutanti di colore può essere individuata mediante l'inclusione contemporanea di appropriati controlli del colore a ogni piastratura. I tessuti e i campioni risultanti (*item*) devono essere trattati e analizzati secondo uno schema a blocchi, in cui gli *item* del gruppo di controllo solvente/mezzo disperdente, del gruppo di controllo positivo (se utilizzato) o del DNA del controllo positivo (se del caso) e di ciascun gruppo di trattamento sono analizzati insieme.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

40. I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. L'unità sperimentale è l'animale. La relazione deve contenere il numero totale di unità formanti placche (pfu) o di unità formanti colonie (cfu), il numero di mutanti e la frequenza dei mutanti per ciascun tessuto di ciascun animale. In caso di reazioni multiple da impaccamento/recupero, la relazione deve riportare il numero di reazioni per campione di DNA. Mentre si devono conservare i dati relativi a ciascuna reazione individuale, è sufficiente riportare solo il numero totale delle unità formanti placche o delle unità formanti colonie. I dati sulla tossicità e i segni clinici quali descritti nel paragrafo 34 vanno riportati nella relazione. Vanno indicati i risultati del sequenziamento per ciascun mutante analizzato, così come i calcoli della frequenza delle mutazioni risultanti per ciascun animale e ciascun tessuto.

Valutazione statistica e interpretazione dei risultati

41. Esistono diversi criteri per stabilire se un risultato è positivo, quali un aumento della frequenza dei mutanti correlata alle dosi somministrate o un netto aumento della frequenza dei mutanti in un unico gruppo sottoposto a trattamento rispetto al gruppo di controllo esposto a solvente/mezzo disperdente. Almeno tre gruppi soggetti esposti alla sostanza in esame devono essere analizzati al fine di ottenere dati sufficienti per l'analisi della relazione dose-risposta. Fermo restando che la rilevanza biologica dei risultati va considerata prioritaria, metodi statistici appropriati possono servire da sostegno alla valutazione dei risultati sperimentali (4) (14) (15) (25) (26). Nei test statistici l'unità sperimentale è l'animale.

42. Una sostanza in esame i cui risultati non soddisfano i criteri sopra descritti per qualsiasi tessuto è considerata non mutagena ai fini del presente saggio. Ai fini della rilevanza biologica di un risultato negativo è opportuno confermare l'esposizione del tessuto.
43. Per le analisi del sequenziamento del DNA, sono disponibili diversi metodi statistici che aiutano ad interpretare i risultati (1) (5) (9) (19).
44. Il fatto di stabilire se i valori osservati rientrano o trascendono l'intervallo storico di controllo può fornire informazioni importanti ai fini della valutazione della significatività biologica della risposta (32).

Relazione sul saggio

45. La relazione sul saggio deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza chimica in esame:

- dati di identificazione e numero CAS, se noto
- fonte, numero del lotto se disponibile;
- caratteristiche fisiche e purezza;
- proprietà fisico-chimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio;
- stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

Solvente/mezzo disperdente:

- motivazione della scelta del mezzo disperdente;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;
- preparazione dei preparati per somministrazione via alimentare, con l'acqua da bere e per inalazione;
- determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali).

Animali sperimentali

- specie/ceppo utilizzato e giustificazione della scelta effettuata,
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di stabulazione, dieta ecc.,
- peso dei singoli animali all'inizio del saggio, con intervallo, media e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali

- controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente),
- dati derivati dallo studio per individuare gli intervalli;
- criteri di selezione delle dosi;
- dettagli della preparazione della sostanza in esame;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;
- criteri di selezione della via di somministrazione;
- metodi di misurazione della tossicità animale, compresi, se disponibili, analisi istopatologiche o ematologiche e la frequenza con cui è stato misurato il peso corporeo e sono state realizzate osservazioni sugli animali;
- metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;
- dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;
- dettagli relativi alla qualità del cibo e dell'acqua.
- descrizione dettagliata dei tempi necessari per il trattamento e campionamento e giustificazione delle scelte;

- metodo di sacrificio;
- procedure di isolamento e di conservazione dei tessuti;
- metodi di isolamento del DNA genomico dei roditori, con recupero del transgene del DNA genomico e trasferimento del DNA transgenico verso un ospite batterico;
- fonte e numero del lotto di tutte le cellule, materiali e reagenti (se del caso);
- metodi di enumerazione dei mutanti;
- metodi di analisi molecolare dei mutanti e loro utilizzo per correggere la clonalità e/o calcolare le frequenze delle mutazioni, se del caso.

Risultati:

- condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;
- peso corporeo e peso degli organi, dopo il sacrificio;
- per ciascun tessuto/animale, valutazione del numero di mutanti, del numero di placche o colonie, frequenza dei mutanti;
- per ciascun gruppo di tessuti/animali, numero di reazioni all'impaccamento per campione di DNA, numero totale di mutanti, frequenza media dei mutanti, deviazione standard;
- relazione dose-risposta, se possibile;
- per ciascun tessuto/animale, numero di mutanti indipendenti e frequenza media di mutazione, nei casi in cui sia stata condotta un'analisi molecolare delle mutazioni;
- dati sui controlli negativi storici e concomitanti, con intervalli, medie e deviazioni standard;
- dati relativi ai controlli positivi concomitanti (o ai controlli positivi del DNA non concomitanti);
- determinazioni analitiche se disponibili (ad esempio, concentrazioni del DNA utilizzate nell'impaccamento, dati del sequenziamento del DNA);
- analisi statistiche e metodi applicati.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), "Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra", *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), "A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement", *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), "Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations" *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), "Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), "Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency", *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), "Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens", *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), "Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice", *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), "Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells", *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), "Bayesian Analysis of Mutational Spectra", *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), "Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), "A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host", *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer", *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update", *Mutation Res.*, **705: 96-106**.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), "Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™-Mouse Mutagenicity Assays", *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall and N. Yajima (2000), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), "Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.
- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), "Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), "The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing", *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212-218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), "Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis", *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), "A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections", *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465-470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), "Spi - Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9-15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), "Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays", *Mutation Res.*, 455(1-2): 191-215.
- (23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), "Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay", *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231-245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), "Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study", *Mutation Res.*, 388(2-3): 249-289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), "Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays", *Mutation Res.* 598: 164-193.

- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), "Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers", *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
 - (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Mutation Res.*, 540: 141-151.
 - (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), "Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations in vivo" in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pagg. 391-410.
 - (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), "A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells", *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
 - (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 - (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
 - (34) Clermont, Y. (1972), "Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal". *Physiol. REV* 52 198-236.
 - (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), "The Epididymis", in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R. G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pagg. 1071-1148.
 - (36) Russell, L.B. (2004), "Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse", *Genetica*, 122: 25-36.
-

Appendice

DEFINIZIONI

Capside: guscio proteinico che circonda una particella virale.

Concatenamero: lunga biomolecola continua composta da multiple copie identiche che si ripetono in serie.

Delezione: mutazione in cui il genoma perde uno o più nucleotidi (sequenziali).

Efficienza dell'impaccamento: efficienza con cui i batteriofagi impaccati sono ritrovati nell'ospite batterico.

Elettroporazione: invio di impulsi di corrente elettrica per aumentare la permeabilità delle membrane cellulari.

Espansione clonale: produzione multipla di cellule a partire da una singola cellula (mutante).

Gene endogeno: gene che ha origine nel genoma.

Gene neutrale: gene non soggetto a pressioni della selezione positiva o negativa.

Gene reporter: gene il cui prodotto (gene mutante) è facilmente individuabile.

Grandi delezioni: delezioni del DNA dell'ordine di grandezza superiore a diversi kilobasi (che sono effettivamente individuate con i saggi di selezione del gene *Spi⁻* e del plasmide *lacZ*).

Impaccamento: sintesi di particelle fagiche infettive a partire da una preparazione di capsidi e code proteiche e di un concatenamero di molecole di DNA di fagi. Tecnica comunemente utilizzata per introdurre DNA clonato in un vettore lambda (separato da siti *cos*) all'interno di particelle lambda infettive.

Inserimento: aggiunta di una o più coppia di basi nucleotidi nella sequenza di DNA.

Jackpot: numero elevato di mutanti generato mediante espansione clonale da una singola mutazione.

Ligazione: formazione di un legame covalente tra due segmenti di molecole di DNA mediante DNA ligasi.

Mitogeno: qualsiasi sostanza che stimola la mitosi (cioè la divisione del nucleo cellulare).

Mutazione per spostamento del sistema di lettura: mutazione genetica consistente nell'inserimento o nella delezione di un numero di nucleotidi diverso da tre o da un multiplo di tre all'interno di una sequenza di DNA che codifica una proteina/un peptide.

Mutazione puntiforme: termine generale che indica una mutazione che interessa solo una piccola sequenza del DNA e che può consistere in piccoli inserimenti, delezioni e sostituzioni di coppie di basi.

Periodo di campionamento: periodo che inizia alla fine del periodo, precedente al sacrificio dell'animale, durante il quale la sostanza non è somministrata e le lesioni del DNA non riparate si fissano in forma di mutazioni stabili.

Periodo di somministrazione: periodo totale durante il quale un animale è sottoposto a somministrazione della sostanza in esame.

Selezione positiva: metodo che consente unicamente ai mutanti di sopravvivere.

Sito *cos*: segmento di DNA a filamento singolo con 12 nucleotidi che si trova ad entrambe le estremità di un genoma a doppio filamento del batteriofago lambda.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Sostanza in esame: qualsiasi sostanza o composto sottoposto a test usando il presente metodo di prova.

Sostituzione di coppie di basi: tipo di mutazione che provoca la sostituzione di una singola base nucleotidica del DNA con un'altra base nucleotidica del DNA.

Transgenico: indicante, o relativo a, un organismo il cui genoma è stato modificato con l'introduzione di uno o più geni di un'altra specie.

Unità formante colonie (cfu): unità di misura per il conteggio delle colonie di batteri vitali.

Unità formante placche (pfu): unità di misura per il conteggio dei batteriofagi vitali.

Variazione extra binomiale: variabilità nelle stime ripetute di una proporzione di popolazione maggiore di quanto ci si potrebbe aspettare se la popolazione avesse una distribuzione binomiale.

Vettore bifunzionale: un vettore costruito in modo tale da essere capace di replicarsi in due diversi tipi di cellula ospite; conseguentemente, il DNA inserito in un vettore bifunzionale può essere testato o manipolato in due diversi tipi di cellule o due diversi organismi.»
