



Consiglio
dell'Unione europea

Bruxelles, 25 febbraio 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

NOTA DI TRASMISSIONE

Origine: Jordi AYET PUIGARNAU, Direttore, per conto del Segretario Generale della Commissione europea

Data: 22 febbraio 2019

Destinatario: Jeppe TRANHOLM-MIKKELSEN, Segretario Generale del Consiglio dell'Unione europea

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

Si trasmette in allegato, per le delegazioni, il documento Annex to D060575/02.

All.: Annex to D060575/02

B.71 PROVE DI SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA IN VITRO RIGUARDANTI L'EVENTO CHIAVE NELL'ATTIVAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE NEL MECCANISMO D'AZIONE DEGLI EFFETTI AVVERSI (AOP) PER LA SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

INTRODUZIONE GENERALE

Metodo di prova basato sull'evento chiave nell'attivazione di cellule dendritiche

1. Per sensibilizzante cutaneo si intende una sostanza che provoca una reazione allergica a contatto con la pelle, secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 dell'Unione europea relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP)¹. Vi è consenso generale circa le principali fasi del processo biologico di sensibilizzazione cutanea. Le attuali conoscenze relative ai meccanismi chimici e biologici associati alla sensibilizzazione cutanea sono state riassunte nel concetto del meccanismo d'azione degli effetti avversi (*AOP, Adverse Outcome Pathway*) nell'ambito del programma AOP dell'OCSE (2), che va dall'evento molecolare scatenante fino agli effetti avversi per la salute (dermatite allergica da contatto), passando attraverso le fasi intermedie. In questo caso l'evento molecolare scatenante (cioè il primo evento chiave) è il legame covalente tra sostanze chimiche elettrofile e i centri nucleofili nelle proteine della pelle. Il secondo evento chiave nell'AOP avviene a livello di cheratinociti e comprende risposte infiammatorie e variazioni di espressione genica, associate a specifiche vie di segnalazione intercellulare come le vie dipendenti dall'elemento di risposta antiossidante/elettrofilo (*ARE, Antioxidant Response Element*). Il terzo evento chiave è l'attivazione di cellule dendritiche (DC), generalmente valutata attraverso l'espressione di specifici marcatori di superficie cellulare, chemochine e citochine. Il quarto evento chiave è l'attivazione e proliferazione dei linfociti T, valutata indirettamente con il test sui linfonodi locali (LLNA) su topi (3).

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

2. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 442E (2017). Esso descrive i saggi *in vitro* riguardanti i meccanismi descritti nell'ambito dell'evento chiave nell'attivazione di cellule dendritiche dell'AOP per la sensibilizzazione cutanea (2). Il metodo di prova comprende prove da utilizzare per distinguere i sensibilizzanti dai non sensibilizzanti cutanei, secondo la definizione del sistema UN GHS e della classificazione CLP.

Nel presente metodo di prova sono descritte le prove seguenti:

- test di attivazione della linea cellulare umana - (h-CLAT)
 - test di attivazione della linea cellulare U937 - (U-SENS™)
 - test con il gene reporter dell'interleuchina-8 (metodo di prova IL-8 Luc).
3. Le prove facenti parte del presente metodo di prova e la corrispondente linea guida dell'OCSE possono differire per quanto riguarda la procedura utilizzata per generare i dati e i risultati misurati, ma possono essere indifferentemente utilizzate per rispondere alle esigenze dei paesi in materia di risultati sperimentali riguardanti l'evento chiave nell'attivazione di cellule dendritiche nell'AOP di sensibilizzazione cutanea, beneficiando nel contempo del sistema di accettazione reciproca dei dati nel quadro dell'OCSE.

Fondamenti e principi delle prove comprese nel metodo di prova basato sull'evento chiave

4. Tipicamente, la valutazione della sensibilizzazione cutanea è effettuata su cavie. I metodi classici che utilizzano cavie - il test di massimizzazione su cavie (*Guinea Pig Maximisation Test*, GPMT) di Magnusson e Kligman e il test di Buehler (metodo di prova B.6) (4) - valutano sia le fasi di induzione che quelle di reazione della sensibilizzazione cutanea. Sono inoltre utilizzati test sui topi - il test LLNA (metodo di prova B.42) (3) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: DA (metodo di prova B.50) (5) e LLNA: BrdU-ELISA (metodo di prova B.51) (6) - che riguardano esclusivamente la reazione di induzione, garantendo un vantaggio rispetto ai test su cavie per quanto riguarda il benessere degli animali e la possibilità di ottenere una misurazione obiettiva della fase di induzione della sensibilizzazione cutanea.
5. Per contribuire alla valutazione del potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche sono stati recentemente adottati metodi di prova *in chemico* e *in vitro* di tipo meccanicistico riguardanti il primo evento chiave [metodo di prova B.59; saggio di reattività peptidica diretta (7)] e il secondo evento chiave [metodo di prova B.60; metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2 (8)] dell'AOP di sensibilizzazione cutanea.
6. Le prove descritte nel presente metodo di prova consentono di quantificare la variazione di espressione dei marcatori di superficie cellulare associati al processo di attivazione di

monociti e DC in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (ad es. CD54, CD86) o le variazioni di espressione di IL-8, una citochina associata all'attivazione di DC. È stato segnalato che i sensibilizzanti cutanei inducono l'espressione di marcatori di membrana cellulare associati all'attivazione di DC (2), quali CD40, CD54, CD80, CD83 e CD86, nonché di citochine proinfiammatorie quali IL-1 β e TNF- α e di varie chemochine, tra cui IL-8 (CXCL8) e CCL3 (9) (10) (11) (12).

7. Tuttavia, poiché l'attivazione di DC costituisce soltanto uno degli eventi chiave dell'AOP di sensibilizzazione cutanea (2) (13), le informazioni ricavate da prove che misurano unicamente i marcatori dell'attivazione di DC possono non essere sufficienti per stabilire se una sostanza chimica presenta o no un potenziale di sensibilizzazione cutanea. Pertanto i dati ricavati dalle prove descritte nel presente metodo di prova possono contribuire a distinguere tra sensibilizzanti (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzati cutanei se utilizzati nell'ambito di approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA), in combinazione con altre informazioni complementari ricavate ad esempio da saggi *in vitro* che prendano in esame altri eventi chiave dell'AOP di sensibilizzazione cutanea nonché da metodi non sperimentali, compresi i metodi *read-across* utilizzati con sostanze chimiche analoghe (13). Esistono in letteratura esempi di utilizzo di dati ricavati da queste prove nell'ambito di approcci definiti, vale a dire approcci standardizzati per quanto riguarda le fonti di informazione utilizzate e la procedura applicata ai dati per formulare previsioni (13), che possono costituire elementi utili nell'ambito di un approccio IATA.
8. Le prove descritte nel presente metodo di prova non possono essere utilizzate da sole, né per la classificazione dei sensibilizzanti cutanei nelle sottocategorie 1A e 1B del sistema UN GHS/CLP, per le autorità che applicano queste due sottocategorie facoltative, né per prevedere la potenza di sensibilizzazione in sede di valutazione della sicurezza. Tuttavia, in funzione del quadro normativo applicabile, i risultati positivi ottenuti con questi metodi possono essere usati isolatamente per classificare una sostanza chimica nella categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP.
9. Il termine "sostanza chimica in esame" utilizzato nel presente metodo di prova designa l'oggetto della prova² e non si riferisce all'applicabilità delle prove per testare sostanze

² In occasione della riunione congiunta dell'OCSE del giugno 2013 è stato concordato che, ove possibile, nelle nuove linee guida aggiornate dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche l'espressione "sostanza chimica in esame" sia utilizzata in modo più coerente per designare la sostanza oggetto della prova.

monocostituente, sostanze multiconstituente e/o miscela. Attualmente disponiamo di informazioni limitate quanto all'applicabilità delle prove a sostanze multiconstituente e a miscela (14) (15). Le prove sono comunque tecnicamente applicabili alle prove su sostanze multiconstituente e miscela. Tuttavia, prima di applicare questo metodo di prova a una miscela per ottenere dati a fini regolamentari, è opportuno chiedersi se, e in caso affermativo perché, i dati ottenuti possono essere ritenuti idonei per i fini regolamentari previsti³. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela. Inoltre, quando si testano sostanze multiconstituente o miscela, occorre prestare attenzione alle possibili interferenze dei costituenti citotossici con le risposte osservate.

³ Questa frase è stata proposta e concordata nella riunione del WNT dell'aprile 2014.

BIBLIOGRAFIA

- (1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Consultabile al seguente indirizzo: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Consultabile al seguente indirizzo: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Capitolo B.42 del presente allegato: Test sui linfonodi locali (LLNA). Capitolo B.6 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea.
- (4) Capitolo B.50 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea: test sui linfonodi locali (LLNA): DA.
- (5) Capitolo B.51 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea: test sui linfonodi locali (LLNA): BrdU-ELISA.
- (6) Capitolo B.59 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea *in chemico*: saggio di reattività peptidica diretta (DPRA).
- (7) Capitolo B.60 del presente allegato: Sensibilizzazione cutanea *in vitro*: metodo di prova della luciferasi ARE-Nrf2.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Appendice 1

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO*: TEST DI ATTIVAZIONE DELLA LINEA CELLULARE UMANA (H-CLAT)

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

1. Il metodo h-CLAT consente di quantificare le variazioni di espressione dei marcatori di superficie cellulare associati al processo di attivazione di monociti e cellule dendritiche (DC) (cioè CD86 e CD54) nella linea cellulare di leucemia monocitica umana THP-1 in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (1)(2). I livelli misurati di espressione dei marcatori di superficie cellulare CD86 e CD54 sono quindi utilizzati per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.
2. Il metodo h-CLAT è stato oggetto di uno studio di validazione in uno dei laboratori di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM*) e di una successiva revisione indipendente *inter pares* sotto la guida del comitato scientifico consultivo dello stesso laboratorio (ESAC). Tenuto conto di tutti i dati disponibili e dei pareri formulati dalle autorità di regolamentazione e dai portatori di interessi, l'EURL ECVAM ha raccomandato l'uso del metodo h-CLAT (3) nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. Nella letteratura scientifica figurano esempi dell'uso dei dati h-CLAT in combinazione con altre informazioni (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. È stato dimostrato che il metodo h-CLAT può essere applicato in laboratori con esperienza nel campo delle tecniche di coltura cellulare e dell'analisi mediante citometria a flusso. Il livello di riproducibilità atteso delle predizioni è dell'ordine dell'80 % a livello intralaboratorio e a livello interlaboratori (3)(12). I risultati dello studio di validazione (13) e di altri studi pubblicati (14) indicano globalmente che, rispetto ai risultati ottenuti con il metodo LLNA, l'accuratezza nella distinzione tra sensibilizzanti (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti cutanei è pari all'85 % (N = 142) per una sensibilità del 93 % (94/101) e una specificità del 66 % (27/41) [sulla base di una nuova analisi dell'EURL ECVAM (12) che ha tenuto conto di tutti i dati esistenti ma non dei risultati negativi per le sostanze chimiche con un Log K_{ow} superiore a 3,5, come descritto al paragrafo 4]. È probabile che i falsi negativi nelle predizioni formulate con il metodo h-CLAT riguardino piuttosto le sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) rispetto alle sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea elevata (sottocategoria 1A

del GHS dell'ONU/CLP) (4)(13)(15). Queste informazioni, nel loro insieme, indicano l'utilità del metodo h-CLAT per l'identificazione dei rischi di sensibilizzazione cutanea. Tuttavia, i valori di accuratezza forniti in questa sede per il metodo h-CLAT utilizzato isolatamente sono puramente indicativi, in quanto la prova dovrebbe essere considerata in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale. Inoltre, nel valutare i metodi di studio della sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che l'LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, può non riflettere pienamente la situazione per l'uomo.

4. I dati attualmente disponibili indicano che il metodo h-CLAT è applicabile alle sostanze chimiche in esame relative a diversi gruppi funzionali organici, meccanismi di reazione, potenze di sensibilizzazione cutanea (determinate negli studi *in vivo*) e proprietà fisico-chimiche (3)(14)(15). Il metodo h-CLAT è applicabile alle sostanze chimiche solubili o che formano una dispersione stabile (colloide o sospensione in cui la sostanza chimica in esame non si deposita né si separa dal solvente/mezzo disperdente formando più fasi) in un solvente/disperdente idoneo (cfr. il paragrafo 14). Le sostanze chimiche con un Log K_{ow} superiore a 3,5 tendono a produrre risultati falsi negativi (14). Pertanto non si deve tener conto dei risultati negativi ottenuti da sostanze chimiche con un Log K_{ow} superiore a 3,5. Tuttavia, i risultati positivi ottenuti da sostanze chimiche che presentano un Log K_{ow} superiore a 3,5 possono comunque essere utilizzati nel processo di identificazione della sostanza chimica come sensibilizzante cutaneo. Inoltre, a causa della capacità metabolica limitata della linea cellulare utilizzata (16) e a causa delle condizioni sperimentali, anche i proaptenti (sostanze che richiedono un'attivazione enzimatica, ad esempio mediante enzimi P450) e i preaptenti (sostanze attivate mediante ossidazione), in particolare quelli a ossidazione lenta, possono dare risultati negativi con il metodo h-CLAT (15). Le sostanze chimiche fluorescenti possono essere valutate con il metodo h-CLAT (17); tuttavia le sostanze chimiche fortemente fluorescenti che emettono alla stessa lunghezza d'onda dell'isotiocianato di fluorescina (FITC) o dello ioduro di propidio (PI) interferiscono con la rilevazione mediante citometria a flusso e pertanto non possono essere correttamente valutate mediante anticorpi coniugati con FITC o PI. In questo caso si può fare ricorso, rispettivamente, ad altri anticorpi marcati con fluorocromo o ad altri marcatori di citotossicità, purché si possa dimostrare, ad esempio testando le sostanze di riferimento indicate nell'appendice 1-2, che essi producono risultati simili agli anticorpi marcati con FITC (cfr. il paragrafo 24) o PI (cfr. il paragrafo 18). Alla luce di quanto precede, i risultati negativi andranno interpretati nel contesto dei limiti indicati e in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA. Nel caso in cui si dimostri che il

metodo di prova h-CLAT non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche in esame, è opportuno evitare di utilizzarlo per tali categorie.

5. Come già precisato, il metodo h-CLAT aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Tuttavia, esso può contribuire anche alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea (4)(5)(9) se utilizzato nell'ambito di approcci integrati quali IATA. Sono tuttavia necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare in che modo i risultati del metodo h-CLAT possano contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.
6. Le definizioni figurano nell'appendice 1.1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Il metodo h-CLAT è una prova *in vitro* che consente di quantificare le variazioni di espressione dei marcatori di superficie cellulare (CD86 e CD54) in una linea cellulare di leucemia monocitica umana (cellule THP-1) dopo 24 ore di esposizione alla sostanza chimica in esame. Tali molecole superficiali sono marcatori tipici dell'attivazione dei monociti THP-1 e possono mimare l'attivazione di DC, che svolge un ruolo cruciale nel *priming* dei linfociti T. Le variazioni di espressione dei marcatori di superficie sono misurate mediante citometria a flusso dopo colorazione cellulare con anticorpi marcati con fluorocromo. In parallelo è inoltre effettuata una misurazione della citotossicità per stabilire se la sovraespressione del marcatore di superficie avviene in presenza di concentrazioni sub-citotossiche. L'intensità di fluorescenza relativa dei marcatori di superficie rispetto al controllo con solvente/disperdente è calcolata e utilizzata in un modello predittivo (cfr. il paragrafo 26) ai fini della distinzione tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA TECNICA

8. Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice relativa al metodo di prova B.71, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 1.2. Inoltre gli utilizzatori del metodo devono mantenere una banca dati storica contenente i dati ottenuti con i controlli di reattività (cfr. il paragrafo 11) nonché con i controlli positivi e con solvente/disperdente (cfr. i paragrafi 20-22) e utilizzare tali dati per confermare la persistenza nel tempo della riproducibilità della prova nel loro laboratorio.

PROCEDURA

9. La presente prova si basa sul protocollo h-CLAT n. 158 del Servizio dati sui metodi alternativi alla sperimentazione animale (*DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation - DB-ALM*) (18) utilizzato per lo studio di validazione coordinato dal laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (EURL ECVAM). Si raccomanda di utilizzare questo protocollo nell'applicazione e nell'impiego del metodo h-CLAT in laboratorio. Di seguito è fornita una descrizione degli elementi e delle procedure principali del metodo h-CLAT, che comprende due fasi: la *prova di determinazione della dose* e la *misurazione dell'espressione di CD86/CD54*.

Preparazione delle cellule

10. Per l'esecuzione del metodo h-CLAT si utilizza la linea cellulare di leucemia monocitica umana (THP-1). Si raccomanda che le cellule (TIB-202™) provengano da una banca di cellule riconosciuta, quale la *American Type Culture Collection*.
11. Le cellule THP-1 sono coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata al 5 % di CO₂, su mezzo di coltura RPMI-1640 integrato da 10 % di siero fetale bovino (FBS), 0,05 mM di 2-mercaptoetanolo, 100 unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. L'uso di penicillina e streptomicina nel mezzo di coltura può essere evitato. In tal caso, tuttavia, gli utilizzatori devono verificare che l'assenza di antibiotici nel mezzo di coltura non incida sui risultati, ad esempio testando le sostanze di riferimento indicate nell'appendice 1.2. In ogni caso, per ridurre al minimo il rischio di contaminazione si dovranno seguire buone prassi di coltura cellulare, a prescindere dalla presenza o no di antibiotici nel mezzo di coltura. Le cellule THP-1 sono regolarmente inoculate ogni 2-3 giorni a una densità compresa tra 0,1 e 0,2 × 10⁶ cellule/ml e vanno mantenute a densità comprese tra 0,1 e 1,0 × 10⁶ cellule/ml. Prima di essere utilizzate per la prova, le cellule devono essere qualificate mediante un controllo di reattività da realizzarsi due settimane dopo lo scongelamento mediante 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) (n. CAS 97-00-7, purezza ≥ 99 %) e solfato di nichel (NiSO₄) (n. CAS 10101-97-0, purezza ≥ 99 %) come controlli positivi e acido lattico (LA) (n. CAS 50-21-5, purezza ≥ 85 %) come controllo negativo. Sia il DNCB che il NiSO₄ devono produrre una risposta positiva per entrambi i marcatori di superficie cellulare CD86 e CD54; LA deve produrre una risposta negativa per entrambi i marcatori di superficie cellulare CD86 e CD54. Possono essere utilizzate per la prova soltanto le cellule che superano il controllo di reattività. Le cellule possono essere moltiplicate fino a due mesi dopo lo scongelamento senza superare 30 passaggi. Il controllo di reattività va effettuato secondo le procedure descritte ai paragrafi 20-24.
12. Per la prova, le cellule THP-1 sono inoculate a una densità di 0,1 × 10⁶ cellule/ml o di 0,2 × 10⁶ cellule/ml e precoltivate in fiasche di coltura per 72 o 48 ore rispettivamente. È importante che la densità cellulare nella fiasca di coltura subito dopo il periodo di precoltura sia quanto più possibile costante in ogni esperimento (grazie al ricorso a una delle

due condizioni di pre-coltura descritte sopra). Infatti, la densità cellulare nella fiasca di coltura subito dopo la pre-coltura può influire sull'espressione di CD86/CD54 indotta da allergeni (19). Il giorno della prova le cellule raccolte dalla fiasca di coltura sono rimesse in sospensione in un nuovo mezzo di coltura a una densità di 2×10^6 cellule/ml. Quindi le cellule sono ripartite su una piastra a fondo piatto a 24 pozzetti con 500 μ l (1×10^6 cellule/pozzetto) o su una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti con 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ cellule/pozzetto).

Prova di determinazione della dose

13. Una *prova di determinazione della dose* è realizzata per determinare il valore CV75, vale a dire la concentrazione della sostanza chimica in esame che produce una vitalità cellulare (CV) del 75 % rispetto al controllo con solvente/disperdente. Il valore CV75 è utilizzato per determinare la concentrazione delle sostanze chimiche in esame per la misurazione dell'espressione di CD86/CD54 (cfr. i paragrafi 20-24).

Preparazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

14. Le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Nel metodo h-CLAT le sostanze chimiche in esame sono disciolte o disperse stabilmente (cfr. anche il paragrafo 4) utilizzando di preferenza, come solvente/disperdente, una soluzione salina o un mezzo o, come seconda opzione se la sostanza chimica in esame non è solubile o non forma una dispersione stabile nei due solventi/mezzi disperdenti precedenti, dimetilsolfossido (DMSO, purezza ≥ 99 %), fino a raggiungere una concentrazione finale di 100 mg/ml (nella soluzione salina o nel mezzo) o di 500 mg/ml (nel DMSO). È possibile utilizzare solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli descritti sopra fornendo una sufficiente giustificazione scientifica. Si deve tenere conto della stabilità della sostanza chimica in esame nel solvente/disperdente finale.
15. A partire dalle soluzioni madre delle sostanze chimiche in esame (100 mg/ml nella soluzione salina o nel mezzo o 500 mg/ml nel DMSO) si procede alle seguenti diluizioni:
 - se il solvente/disperdente è una soluzione salina o un mezzo: vengono preparate otto soluzioni madre (otto concentrazioni) mediante diluizioni doppie in serie realizzate con l'opportuno solvente/disperdente. Queste soluzioni madre sono poi nuovamente diluite di un fattore 50 nel mezzo di coltura (soluzioni di lavoro). Se la concentrazione finale massima di 1 000 μ g/ml nella piastra non è tossica occorre determinare nuovamente la concentrazione massima mediante un altro test di citotossicità. La concentrazione finale nella piastra non deve superare 5 000 μ g/ml per le sostanze chimiche in esame disciolte o disperse stabilmente in una soluzione salina o un mezzo.

- Se il solvente/disperdente è il DMSO: vengono preparate otto soluzioni madre (otto concentrazioni) mediante diluizioni doppie in serie realizzate con l'opportuno solvente/disperdente. Queste soluzioni madre sono poi nuovamente diluite di un fattore 250 nel mezzo di coltura (soluzioni di lavoro). La concentrazione finale nella piastra non deve superare 1 000 µg/ml, anche se tale concentrazione non è tossica.

Le soluzioni di lavoro sono infine utilizzate per l'esposizione aggiungendo un volume uguale di soluzione di lavoro al volume della sospensione di cellule THP-1 nella piastra (cfr. anche il paragrafo 17) per ottenere un'ulteriore diluizione doppia (generalmente, le concentrazioni finali nella piastra vanno da 7,81 a 1000 µg/ml).

16. Il controllo con solvente/disperdente utilizzato nel metodo h-CLAT è il mezzo di coltura [per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente (cfr. il paragrafo 4) nel mezzo o nella soluzione salina] o il DMSO (per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente nel DMSO) ed è testato a una concentrazione finale unica nella piastra di 0,2%. Esso è sottoposto alla stessa diluizione descritta per le soluzioni di lavoro al paragrafo 15.

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

17. Il mezzo di coltura o le soluzioni di lavoro descritti ai paragrafi 15 e 16 sono mescolati nella proporzione 1:1 (v/v) con le sospensioni cellulari preparate nella piastra a fondo piatto a 24 o 96 pozzetti (cfr. il paragrafo 12). Le piastre trattate sono quindi messe in incubazione per $24 \pm 0,5$ ore a una temperatura di 37 °C con il 5 % di CO₂. Si avrà cura di evitare l'evaporazione delle sostanze chimiche volatili in esame nonché la contaminazione incrociata tra i pozzetti da parte delle sostanze stesse, ad esempio sigillando la piastra prima dell'incubazione con le sostanze chimiche in esame (20).

Colorazione con ioduro di propidio (PI)

18. Dopo $24 \pm 0,5$ ore di esposizione le cellule sono trasferite in provette e raccolte mediante centrifugazione. I supernatanti vengono scartati e le cellule rimanenti sono rimesse in sospensione in 200 µl (in caso di piastra a 96 pozzetti) o 600 µl (in caso di piastra a 24 pozzetti) di tampone fosfato isotonicamente contenente lo 0,1 % di sieroalbumina bovina (tampone di colorazione). 200 µl di sospensione cellulare sono trasferiti in una piastra a fondo rotondo a 96 pozzetti (in caso di piastra a 96 pozzetti) o in una microprovetta (in caso di piastra a 24 pozzetti) e lavati due volte con 200 µl (in caso di piastra a 96 pozzetti) o 600 µl (in caso di piastra a 24 pozzetti) di tampone di colorazione. Infine, le cellule sono rimesse in sospensione nel tampone di colorazione (ad es. 400 µl) ed è aggiunta una soluzione di PI (ad es. 20 µl) (per ottenere, ad esempio, una concentrazione finale di PI di 0,625 µg/ml). È possibile utilizzare altri marcatori di citotossicità, tra cui la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e il blu di tripano, purché si dimostri che tali coloranti

alternativi producono risultati simili al PI, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 1.2.

Misurazione della citotossicità mediante citometria a flusso e stima del valore CV75

19. L'assorbimento di PI è analizzato mediante citometria a flusso sul canale di acquisizione FL-3. Vengono complessivamente raccolte 10 000 cellule vive (negative al PI). La vitalità cellulare può essere calcolata dal programma di analisi del citometro mediante l'equazione riportata di seguito. Se la vitalità cellulare è bassa si dovrebbero raccogliere fino a 30 000 cellule, comprese le cellule morte. Un'opzione alternativa consiste nell'acquisire i dati per un minuto dall'inizio dell'analisi.

$$\text{Vitalità cellulare} = \frac{\text{Numero di cellule vive}}{\text{Numero totale di cellule analizzate}} \times 100$$

Il valore CV75 (cfr. il paragrafo 13), cioè una concentrazione che produce il 75 % di sopravvivenza di cellule THP-1 (25 % di citotossicità), è calcolato per interpolazione log-lineare mediante la seguente equazione:

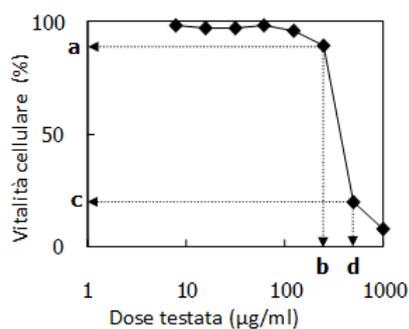
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

in cui:

a è il valore minimo di vitalità cellulare superiore a 75 %

c è il valore massimo di vitalità cellulare inferiore a 75 %

b e *d* sono le concentrazioni che producono rispettivamente i valori di vitalità cellulare *a* e *c*



È possibile utilizzare altri metodi per calcolare il valore CV75, purché sia provato che ciò non incide sui risultati (ad es. testando le sostanze di riferimento).

Misurazione dell'espressione di CD86/CD54

Preparazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

20. È utilizzato il solvente/disperdente appropriato (soluzione salina, mezzo o DMSO; cfr. il paragrafo 14) per dissolvere le sostanze chimiche in esame o creare una dispersione stabile. Le sostanze chimiche in esame sono dapprima diluite a una concentrazione pari a 100 volte (soluzione salina o mezzo) o 500 volte (DMSO) il valore $CV_{75} \times 1,2$ determinato nella *prova di determinazione della dose* (cfr. il paragrafo 19). Se non è possibile determinare il valore CV_{75} (cioè se la tossicità osservata nella *prova di determinazione della dose* non è sufficiente), si utilizzerà come concentrazione iniziale la concentrazione solubile o in dispersione stabile più elevata della sostanza chimica in esame preparata con ciascun solvente/disperdente. Si osservi che la concentrazione finale nella piastra non deve superare 5 000 $\mu\text{g/ml}$ (in caso di soluzione salina o mezzo) o 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (in caso di DMSO). Vengono quindi effettuate diluizioni in serie di un fattore 1,2 utilizzando il solvente/disperdente corrispondente per ottenere le soluzioni madre [otto concentrazioni comprese tra $100 \times 1,2 \times CV_{75}$ e $100 \times 0,335 \times CV_{75}$ (soluzione salina o mezzo) o tra $500 \times 1,2 \times CV_{75}$ e $500 \times 0,335 \times CV_{75}$ (DMSO)] che saranno testate con il metodo h-CLAT (per un esempio di schema di dosaggio si veda il protocollo DB-ALM n. 158). Le soluzioni madre sono quindi ulteriormente diluite di un fattore 50 (soluzione salina o mezzo) o 250 (DMSO) nel mezzo di coltura (soluzioni di lavoro). Queste soluzioni di lavoro sono infine utilizzate per l'esposizione, dopo una diluizione finale di fattore 2 nella piastra. Se i risultati non soddisfano i criteri di accettabilità descritti ai paragrafi 29 e 30 per la vitalità cellulare, la *prova di determinazione della dose* può essere ripetuta per calcolare un valore CV_{75} più preciso. Si osservi che per la misurazione dell'espressione di CD86/CD54 possono essere utilizzate unicamente piastre a 24 pozzetti.
21. Il controllo con solvente/disperdente è preparato come descritto al paragrafo 16. Il controllo positivo utilizzato nel metodo h-CLAT è il DNCB (cfr. il paragrafo 11), di cui si preparano soluzioni madre in DMSO che sono poi diluite come descritto per le soluzioni madre al paragrafo 20. Il DNCB deve essere utilizzato come controllo positivo per la *misurazione dell'espressione di CD86/CD54* a una concentrazione finale unica nella piastra (generalmente 4,0 $\mu\text{g/ml}$). Per ottenere una concentrazione di 4,0 $\mu\text{g/ml}$ di DNCB nella piastra si prepara una soluzione madre di 2 mg/ml di DNCB in DMSO e la si diluisce ulteriormente di un fattore 250 nel mezzo di coltura fino ad ottenere una soluzione di lavoro di 8 $\mu\text{g/ml}$. In alternativa è possibile utilizzare, come concentrazione del controllo positivo, il valore CV_{75} del DNCB determinato in ciascun centro di prova. Altri controlli positivi adeguati possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la batteria di prove. Per i controlli positivi la concentrazione finale nella piastra non deve superare 5 000 $\mu\text{g/ml}$ (in caso di soluzione salina o mezzo) o 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (in caso di DMSO). I criteri di accettabilità della batteria di prove sono identici a quelli descritti per la sostanza chimica in esame (cfr. il paragrafo 29),

ad eccezione dell'ultimo criterio di accettabilità in quanto il controllo positivo è testato a una concentrazione unica.

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

22. Per ogni sostanza chimica in esame e sostanza di controllo è necessario un esperimento al fine di ottenere una predizione. Ogni esperimento consiste in almeno due batterie di prove indipendenti per la *misurazione dell'espressione di CD86/CD54* (cfr. i paragrafi 26-28). Le batterie di prove indipendenti hanno luogo in giorni diversi, o nello stesso giorno a condizione che, per ciascuna batteria di prove: a) siano preparate soluzioni madre e soluzioni di lavoro nuove e indipendenti della sostanza chimica in esame e delle soluzioni di anticorpi e b) siano utilizzate cellule raccolte in modo indipendente (cioè provenienti da matracci diversi); tuttavia, le cellule possono provenire dallo stesso passaggio. Le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo preparate come soluzioni di lavoro (500 µl) sono miscelate con 500 µl di cellule in sospensione (1×10^6 cellule) in proporzione di 1:1 e le cellule sono messe in incubazione per $24 \pm 0,5$ ore come descritto ai paragrafi 20 e 21. Per ogni prova è sufficiente un'unica replica per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame e della sostanza di controllo, in quanto la predizione è ricavata da almeno due batterie di prove indipendenti.

Colorazione cellulare e analisi

23. Dopo $24 \pm 0,5$ ore di esposizione le cellule sono trasferite dalla piastra a 24 pozzetti in provette, raccolte per centrifugazione e successivamente lavate due volte con un 1 ml di tampone di colorazione (se necessario possono essere eseguite ulteriori tappe di lavaggio). Dopo il lavaggio le cellule vengono bloccate con 600 µl di soluzione bloccante [tampone di colorazione contenente lo 0,01% (p/v) di globulina (frazione di Cohn II, III, umana; SIGMA, #G2388-10G o equivalente)] e messe in incubazione a 4 °C per 15 minuti. Una volta bloccate le cellule vengono ripartite in tre aliquote da 180 µl su una piastra a fondo rotondo a 96 pozzetti o in una microprovetta.
24. Dopo la centrifugazione le cellule sono sottoposte a colorazione con 50 µl di anticorpi marcati con FITC anti-CD86, anti-CD54 o di anticorpi murini IgG1 (isotipo) a 4 °C per 30 minuti. Gli anticorpi descritti nel protocollo h-CLAT n. 158 della banca dati DB-ALM (18) devono essere diluiti in un tampone di colorazione in proporzione di 3:25 v/v [per CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)] o di 3:50 v/v [per CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)]. Tali fattori di diluizione degli anticorpi sono stati definiti dagli sviluppatori del metodo di prova come i fattori che offrono il migliore rapporto segnale-disturbo. Sulla base dell'esperienza degli sviluppatori del metodo di prova, l'intensità di fluorescenza dei vari lotti di anticorpi è generalmente costante. Tuttavia gli utilizzatori possono decidere di effettuare la titolazione degli anticorpi nelle loro condizioni di laboratorio per definire le concentrazioni più adatte all'uso. È possibile

avvalersi di altri anticorpi marcati con fluorocromo anti-CD86 e/o anti-CD54 purché si possa dimostrare che essi producono risultati simili agli anticorpi coniugati con FITC, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 1.2. Va osservato che un cambiamento di clone o di fornitore di anticorpi quale descritto nel protocollo h-CLAT n. 158 della banca dati DB-ALM (18) può incidere sui risultati. Dopo essere state lavate due o più volte con 150 µl di tampone di colorazione, le cellule sono rimesse in sospensione in un campione di colorazione (ad es. 400 µl) cui è aggiunta la soluzione di PI (ad es. 20 µl per ottenere una concentrazione finale di 0,625 µg/ml) o di un altro marcatore di tossicità (cfr. il paragrafo 18). I livelli di espressione di CD86 e CD54 e la vitalità cellulare sono analizzati mediante citometria a flusso.

DATI E RELAZIONI

Valutazione dei dati

25. Il livello di espressione di CD86 e CD54 è analizzato mediante citometria a flusso sul canale di acquisizione FL-1. Sulla base della media geometrica dell'intensità di fluorescenza (MFI), l'intensità di fluorescenza relativa (RFI) di CD86 e CD54 per le cellule di controllo positivo (ctrl) e per quelle trattate con la sostanza chimica è calcolata mediante la seguente equazione:

$$RFI = \frac{MFI \text{ delle cellule trattate con la sostanza chimica} - MFI \text{ delle cellule di controllo isotipo trattate con la sostanza chimica}}{MFI \text{ delle cellule di controllo trattate con solvente/disperdente} - MFI \text{ delle cellule di controllo isotipo trattate con solvente/disperdente}} \times 100$$

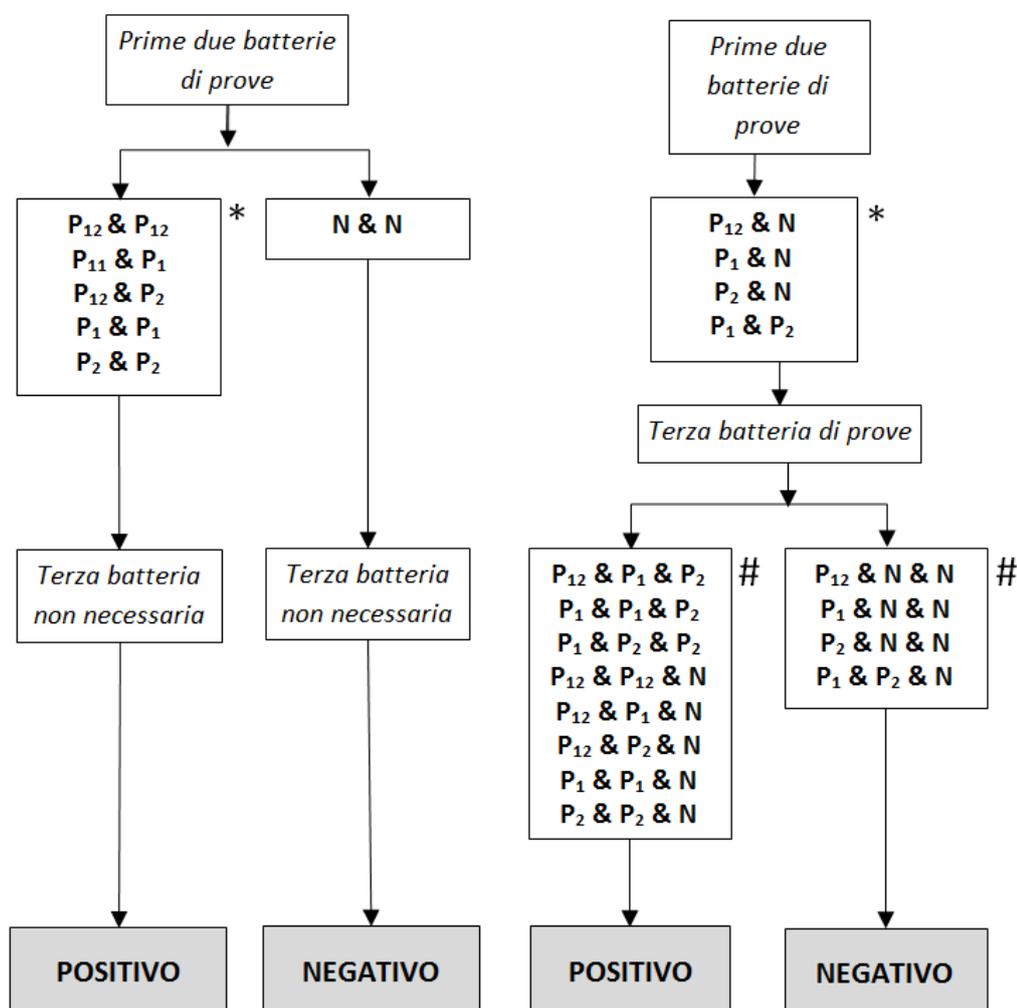
È inoltre calcolata la vitalità cellulare delle cellule di controllo isotipo (ctrl) [colorate con anticorpi murini IgG1 (isotipo)] mediante l'equazione descritta al paragrafo 19.

Modello predittivo

26. Per la misurazione dell'espressione di *CD86/CD54* ciascuna sostanza chimica è testata in almeno due prove indipendenti per ottenere una predizione unica (POSITIVA o NEGATIVA). Una predizione h-CLAT è considerata POSITIVA se almeno una delle condizioni elencate di seguito è soddisfatta in 2 prove indipendenti su 2 o in almeno 2 prove indipendenti su 3; in caso contrario, la predizione h-CLAT è considerata NEGATIVA (figura 1):
- l'RFI di CD86 è pari o superiore a 150 % in tutte le concentrazioni testate (con una vitalità cellulare ≥ 50 %);
 - l'RFI di CD54 è pari o superiore a 200 % in tutte le concentrazioni testate (con una vitalità cellulare ≥ 50 %).
27. Sulla base di quanto precede, se le prime due batterie di prove sono entrambe positive per CD86 e/o sono entrambe positive per CD54, la predizione h-CLAT è considerata

POSITIVA e non è necessario eseguire una terza batteria di prove. Analogamente, se le prime due batterie di prove sono negative per entrambi i marcatori, la predizione h-CLAT è considerata NEGATIVA (tenuto conto di quanto disposto al paragrafo 30) e non è necessario eseguire una terza batteria di prove. Tuttavia, se i risultati delle prime due batterie di prove differiscono per almeno uno dei marcatori (CD54 o CD86), è necessario effettuare una terza batteria di prove e la predizione finale sarà basata sul risultato ottenuto nella maggioranza delle tre batterie di prove individuali (cioè 2 su 3). A questo proposito va osservato che se vengono svolte due batterie di prove indipendenti e una di queste è positiva soltanto per CD86 (di seguito, P_1) e l'altra è positiva soltanto per CD54 (di seguito, P_2), è necessario procedere a una terza batteria di prove. Se questa terza batteria di prove è negativa per entrambi i marcatori (di seguito, N), la predizione h-CLAT è considerata NEGATIVA. D'altro canto, se la terza batteria di prove è positiva per uno dei marcatori (P_1 o P_2) o per entrambi i marcatori (di seguito, P_{12}), la predizione h-CLAT è considerata POSITIVA.

Figura 1: Modello predittivo utilizzato nel metodo di prova h-CLAT. Una predizione h-CLAT va considerata nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale.



P₁: prova positiva soltanto per CD86; P₂: prova positiva soltanto per CD54; P₁₂: prova positiva sia per CD86 che per CD54; N: prova non positiva per CD86 né per CD54;

* I riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime due batterie di prove, a prescindere dall'ordine in cui possono essere ottenuti.

I riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime tre batterie di prove sulla base dei risultati ottenuti nelle prime due batterie di prove (riportati nel riquadro che precede), ma non rispecchiano l'ordine in cui possono essere ottenuti.

28. Per le sostanze chimiche in esame per le quali il metodo h-CLAT ha fornito una predizione POSITIVA possono essere eventualmente determinati due valori di concentrazione efficace (EC) (EC150 per CD86 e EC200 per CD54), vale a dire la concentrazione alla quale le sostanze chimiche in esame producono un'RFI di 150 o 200. Tali valori EC potrebbero contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea (9) se

utilizzati nell'ambito di approcci integrati quali IATA (4) (5) (6) (7) (8). Essi possono essere calcolati mediante le seguenti equazioni:

$$EC150 \text{ (per CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (per CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

in cui

A_{conc} è la concentrazione più bassa in $\mu\text{g/ml}$ con $\text{RFI} > 150$ (CD86) o 200 (CD54)

B_{conc} è la concentrazione più elevata in $\mu\text{g/ml}$ con $\text{RFI} > 150$ (CD86) o 200 (CD54)

A_{RFI} è l'RFI alla concentrazione più bassa in $\mu\text{g/ml}$ con $\text{RFI} > 150$ (CD86) o 200 (CD54)

B_{RFI} è l'RFI alla concentrazione più elevata in $\mu\text{g/ml}$ con $\text{RFI} > 150$ (CD86) o 200 (CD54)

Per determinare con maggior precisione i valori EC150 e EC200 possono essere necessarie tre prove indipendenti di *misurazione dell'espressione di CD86/CD54*. I valori finali EC150 e EC200 sono quindi determinati come mediana delle EC calcolate sulla base delle tre batterie di prove indipendenti. Se solo due delle tre batterie di prove indipendenti soddisfano i criteri di positività (cfr. i paragrafi 26-27) viene adottato il valore EC150 o EC200 più elevato tra i due valori calcolati.

Criteri di accettabilità

29. I seguenti criteri di accettabilità devono essere soddisfatti quando si utilizza il metodo di prova h-CLAT (22) (27).

- I valori di vitalità cellulare dei controlli con mezzo e con solvente/disperdente devono essere superiori a 90 %.
- Nel controllo con solvente/disperdente i valori RFI di CD86 e CD54 non devono superare i criteri di positività (CD86 $\text{RFI} \geq 150$ % e CD54 $\text{RFI} \geq 200$ %). I valori RFI del controllo con solvente/disperdente sono calcolati mediante la formula descritta al paragrafo 25 [sostituendo "MFI della sostanza chimica" con "MFI del solvente/disperdente" e "MFI del solvente/disperdente" con "MFI del controllo (mezzo)"].
- Per entrambi i controlli (mezzo e solvente/disperdente) il rapporto MFI CD86-controllo isotipo e MFI CD54-controllo isotipo deve essere > 105 %.
- Nel controllo positivo (DN CB) i valori RFI di CD86 e CD54 devono soddisfare i criteri di positività (CD86 $\text{RFI} \geq 150$ e CD54 $\text{RFI} \geq 200$) e la vitalità cellulare deve essere superiore a 50 %.
- Per la sostanza chimica in esame la vitalità cellulare deve essere superiore a 50 % in almeno quattro concentrazioni testate in ciascuna batteria di prove.

30. Un risultato negativo è accettabile soltanto per le sostanze chimiche in esame che presentano una vitalità cellulare inferiore a 90 % alla massima concentrazione testata (cioè $1,2 \times CV75$ in base allo schema di diluizione in serie descritto al paragrafo 20). Se la vitalità cellulare a $1,2 \times CV75$ è pari o superiore a 90 % il risultato negativo non deve essere preso in considerazione. In tal caso si raccomanda di cercare di migliorare la scelta delle dosi ripetendo la determinazione del valore CV75. Va osservato che ove si utilizzi una concentrazione di 5 000 µg/ml in soluzione salina (o mezzo o altri solventi/disperdenti), una concentrazione di 1 000 µg/ml in DMSO o la concentrazione massima di solubilità come concentrazione massima di prova di una sostanza chimica in esame, un risultato negativo è accettabile anche in presenza di una vitalità cellulare superiore a 90 %.

Relazione sulla prova

31. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostrituente:

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- aspetto fisico, Log K_{ow} , idrosolubilità, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Sostanza multicostrituente, UVCB o miscela:

- caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;
- aspetto fisico, idrosolubilità, solubilità nel DMSO e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;

- peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Controlli

Controllo positivo

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- aspetto fisico, Log K_{ow} , idrosolubilità, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.

Controllo negativo e controllo con solvente/disperdente

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- aspetto fisico, peso molecolare e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli menzionati nelle linee guida e se disponibili;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni della prova

- nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;
- descrizione della prova utilizzata
- linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);
- tipo di citometria a flusso utilizzato (ad es. modello), comprese le impostazioni dello strumento, globulina, anticorpi e marcatore di citotossicità utilizzati;
- procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'esecuzione della prova mediante sostanze di riferimento o nel dimostrare la riproducibilità della prova nel tempo, ad esempio dati storici dei controlli e/o dei controlli di reattività.

Criteri di accettabilità della prova:

- vitalità cellulare, valori MFI e RFI ottenuti con il controllo con solvente/disperdente rispetto agli intervalli di accettabilità;
- vitalità cellulare e valori RFI ottenuti con il controllo positivo rispetto agli intervalli di accettabilità;
- vitalità cellulare di tutte le concentrazioni testate della sostanza chimica in esame.

Procedura

- numero di prove realizzate;
- concentrazioni della sostanza chimica in esame, applicazione e tempo di esposizione (se diverso da quello raccomandato);
- durata di esposizione (se diversa da quella raccomandata);
- descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;
- descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

- presentazione dei dati in formato tabulare, ivi compreso CV75 (se del caso), MFI geometrica individuale, RFI, valori di vitalità cellulare, valori EC150/EC200 (se del caso) ottenuti per la sostanza chimica in esame e per il controllo positivo in ciascuna batteria di prove, e indicazione della classificazione della sostanza chimica in esame secondo il modello predittivo;
- descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

- discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova h-CLAT;
- esame dei risultati della prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Consultabile al seguente indirizzo: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization

- hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Consultabile al seguente indirizzo: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report consultabile al seguente indirizzo: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.

- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Consultabile al seguente indirizzo: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Parigi, Francia, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Consultabile al seguente indirizzo: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H,

Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Appendice 1.1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con la prova e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza della prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza", per indicare la proporzione di risultati corretti di una prova (21).

AOP (*Adverse Outcome Pathway, meccanismo d'azione degli effetti avversi*): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso *in vivo* (22).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV75: concentrazione stimata che presenta una vitalità cellulare del 75 %.

EC150: concentrazioni che producono RFI di 150 per l'espressione di CD86.

EC200: concentrazioni che producono RFI di 200 per l'espressione di CD54.

Citometria a flusso: tecnica citometrica in cui le cellule sospese in un fluido passano velocemente e singolarmente attraverso un fascio luminoso di eccitazione, producendo schemi di diffusione della luce che sono caratteristici delle cellule e dei loro componenti; le cellule sono spesso marcate con marcatori fluorescenti di modo che la luce sia dapprima assorbita e quindi emessa a un'altra frequenza.

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

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment, approcci integrati in materia di prove e valutazioni*): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

Controllo con mezzo: una replica non trattata che contiene tutti i componenti di un sistema di prova. Questo campione subisce il medesimo procedimento dei campioni trattati con la sostanza chimica in esame e di altri campioni di controllo al fine di determinare se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

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

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

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

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

Preapteni: sostanze chimiche attivate tramite trasformazione abiotica.

Proapteni: sostanze chimiche che necessitano di una bioattivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea.

Intensità di fluorescenza relativa (RFI): valore relativo della media geometrica dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle cellule esposte alla sostanza chimica in esame confrontato con l'MFI di cellule trattate con solvente/disperdente.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto ricercato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (21).

Affidabilità: misura in cui una prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (21).

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

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

Tampone di colorazione: tampone fosfato salino contenente 0,1 % di albumina di siero bovino.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente/disperdente utilizzato. È utilizzato per stabilire la risposta di base per i campioni

trattati con la sostanza chimica in esame disciolta o in dispersione stabile nello stesso solvente/disperdente. Se testato in concomitanza con un controllo con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

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

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

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

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (23).

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

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo (21).

Appendice 1.2

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice per il metodo di prova B.71, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo correttamente la predizione attesa con il metodo h-CLAT per le 10 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori CV75, EC150 e EC200 che rientrino nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 10 sostanze di riferimento. Tali sostanze sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte per quanto riguarda i pericoli di sensibilizzazione cutanea. Altri criteri di selezione riguardavano la disponibilità in commercio delle sostanze e la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* e di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo h-CLAT. Sono inoltre disponibili dati di riferimento pubblicati per il metodo h-CLAT (3) (14).

Tabella 1: Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il metodo h-CLAT

Sostanze di prova per la verifica della competenza	N. CAS	Stato fisico	Predizione <i>in vivo</i> ¹	Intervallo di riferimento CV75 in µg/ml ²	Risultati h-CLAT per CD86 (intervallo di riferimento EC150 in µg/ml) ²	Risultati h-CLAT per CD54 (intervallo di riferimento EC200 in µg/ml) ²
2,4-Dinitroclorobenzene	97-00-7	Solido	Sensibilizzante (estremamente elevato)	2-12	Positivo (0,5-10)	Positivo (0,5-15)
4-Fenilendiammina	106-50-3	Solido	Sensibilizzante (elevato)	5-95	Positivo (<40)	Negativo (>1,5) ³
Solfato di nichel	10101-97-0	Solido	Sensibilizzante (moderato)	30-500	Positivo (<100)	Positivo (10-100)
2-Mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Solido	Sensibilizzante (moderato)	30-400	Negativo (>10) ³	Positivo (10-140)
R(+)-Limonene	5989-27-5	Liquido	Sensibilizzante (debole)	>20	Negativo (>5) ³	Positivo (<250)
Imidazolidinil urea	39236-46-9	Solido	Sensibilizzante (debole)	25-100	Positivo (20-90)	Positivo (20-75)
Isopropanolo	67-63-0	Liquido	Non sensibilizzante	>5000	Negativo (>5000)	Negativo (>5000)
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Non sensibilizzante	>5000	Negativo (>5000)	Negativo (>5000)
Acido lattico	50-21-5	Liquido	Non sensibilizzante	1500-5000	Negativo (>5000)	Negativo (>5000)
Acido 4-amminobenzoico	150-13-0	Solido	Non sensibilizzante	>1000	Negativo (>1000)	Negativo (>1000)

Abbreviazioni: N. CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).

¹ La predizione *in vivo* del pericolo (e della potenza) è basata su dati LLNA (3) (14). La potenza *in vivo* è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (24).

² Sulla base dei dati storici osservati (13) (25).

³ Storicamente la maggioranza dei dati ottenuti per questo marcatore era negativa, per cui ci si aspetta per lo più un risultato

negativo. L'intervallo indicato è stato definito sulla base dei pochi risultati storici positivi osservati. Se si ottiene un risultato positivo il valore EC deve essere compreso nell'intervallo di riferimento indicato.

Appendice 2

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO*: TEST DI ATTIVAZIONE DELLA LINEA CELLULARE U937 - (U-SENS™)

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

1. Il metodo U-SENS™ consente di quantificare la variazione di espressione di un marcatore di superficie cellulare associato al processo di attivazione di monociti e cellule dendritiche (DC) (cioè CD86) nella linea cellulare di linfoma istiocitico umano U937 in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (1). I livelli misurati di espressione del marcatore di superficie cellulare CD86 nella linea cellulare U937 sono quindi utilizzati per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.
2. Il metodo U-SENS™ è stato oggetto di uno studio di validazione (2) coordinato da L'Oreal e di una successiva revisione indipendente *inter pares* effettuata sotto la guida del comitato scientifico consultivo (ESAC) del laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le alternative alla sperimentazione animale (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM*) (3). Tenuto conto di tutti i dati disponibili e dei pareri formulati dalle autorità di regolamentazione e dai portatori di interessi, l'EURL ECVAM ha raccomandato l'uso del metodo U-SENS™ (4) nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. Nel suo documento orientativo sull'elaborazione di relazioni riguardanti approcci strutturati di integrazione dei dati e uso di fonti individuali di informazioni nell'ambito dell'approccio IATA per la sensibilizzazione cutanea, l'OCSE analizza una serie di studi di caso e descrive differenti strategie di prova e modelli predittivi. Uno degli approcci definiti si basa sul metodo di prova U-SENS (5). Esistono inoltre in letteratura (4)(5)(7) esempi dell'uso dei dati U-SENS™ in combinazione con altre informazioni, compresi dati storici e dati umani validi preesistenti (6).
3. È stato dimostrato che il metodo U-SENS™ può essere applicato in laboratori con esperienza nel campo delle tecniche di coltura cellulare e dell'analisi mediante citometria a flusso. Il livello di riproducibilità atteso delle predizioni è dell'ordine del 90 % a livello intralaboratorio e dell'84 % a livello interlaboratori (8). I risultati dello studio di validazione (8) e di altri studi pubblicati (1) indicano globalmente che, rispetto ai risultati ottenuti con l'LLNA, l'accuratezza nella distinzione tra sensibilizzanti cutanei (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti è pari all'86 % (N=166) per una sensibilità del 91 % (118/129) e una specificità del 65 % (24/37). Rispetto ai risultati ottenuti nell'uomo, l'accuratezza nella distinzione tra sensibilizzanti cutanei (categoria 1 del GHS

dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti è pari al 77 % (N=101) per una sensibilità del 100 % (58/58) e una specificità del 47 % (20/43). Rispetto all'LLNA, è più probabile che i falsi negativi nelle predizioni formulate con il metodo U-SENSTM riguardino sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) piuttosto che sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea elevata (sottocategoria 1A del GHS dell'ONU/CLP) (1)(8)(9). L'insieme di queste informazioni indica l'utilità del metodo di prova U-SENSTM come elemento in grado di contribuire all'identificazione dei pericoli di sensibilizzazione cutanea. Tuttavia, i valori di accuratezza forniti in questa sede per il metodo U-SENSTM utilizzato isolatamente sono puramente indicativi, in quanto la prova dovrebbe essere considerata in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale. Inoltre, nel valutare i metodi di studio della sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che l'LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, può non riflettere pienamente la situazione per l'uomo.

4. I dati attualmente disponibili mostrano che il metodo di prova U-SENSTM è applicabile a sostanze chimiche in esame (compresi ingredienti di cosmetici quali conservanti, tensioattivi, sostanze attive, coloranti) che coprono diversi gruppi funzionali organici, proprietà fisico-chimiche, potenze di sensibilizzazione cutanea (determinate nell'ambito di studi in *in vivo*) e l'insieme dei meccanismi di reazione notoriamente associati alla sensibilizzazione cutanea (accettore di Michael, sintesi di una base di Schiff, agente acilante, sostituzione nucleofila bimolecolare [SN₂], o sostituzione nucleofila aromatica [SN_{Ar}]) (1)(8)(9)(10). Il metodo di prova U-SENSTM è applicabile alle sostanze chimiche solubili o che formano una dispersione stabile (colloide o sospensione in cui la sostanza chimica in esame non si deposita né si separa dal solvente/mezzo disperdente formando più fasi) in un solvente/disperdente idoneo (cfr. il paragrafo 13). Le sostanze chimiche della banca dati classificate come preaptenti (sostanze attivate mediante ossidazione) o proaptenti (sostanze che richiedono un'attivazione enzimatica, ad esempio mediante enzimi P450) sono state correttamente identificate con il metodo U-SENSTM (1) (10). Le sostanze chimiche in grado di provocare la rottura della membrana possono dar luogo a falsi positivi a causa di un aumento non specifico dell'espressione di CD86. In effetti, 3 dei 7 falsi positivi in relazione alla classificazione di riferimento *in vivo* erano tensioattivi (1). Pertanto risultati positivi con tensioattivi vanno considerati con cautela, mentre risultati negativi con tensioattivi possono essere utilizzati nel processo di identificazione della sostanza chimica in esame come non sensibilizzante. Le sostanze chimiche fluorescenti possono essere valutate con il metodo U-SENSTM (1); tuttavia, le sostanze chimiche fortemente fluorescenti che emettono alla stessa lunghezza d'onda dell'isotiocianato di fluorescina (FITC) o dello ioduro di propidio (PI) interferiscono con la rilevazione

mediante citometria a flusso e pertanto non possono essere correttamente valutate mediante anticorpi coniugati con FITC (rischio di falso negativo) o PI (vitalità non misurabile). In questo caso si può fare ricorso, rispettivamente, ad altri anticorpi marcati con fluorocromo o ad altri marcatori di citotossicità, purché si possa dimostrare, ad esempio testando le sostanze di riferimento indicate nell'appendice 2.2, che essi producono risultati simili agli anticorpi marcati con FITC o PI (cfr. il paragrafo 18). Alla luce di quanto precede, i risultati positivi con tensioattivi e i risultati negativi con sostanze chimiche fortemente fluorescenti andranno interpretati nel contesto dei limiti indicati e in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA. Nel caso in cui si dimostri che il metodo di prova U-SENS™ non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche in esame, è opportuno evitare di utilizzarlo per tali categorie.

5. Come già precisato, il metodo U-SENS™ aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Tuttavia, esso può contribuire anche alla valutazione della potenza di sensibilizzazione cutanea se utilizzato nell'ambito di approcci integrati quali IATA. Sono però necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare in che modo i risultati del metodo U-SENS™ possano contribuire alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.
6. Le definizioni figurano nell'appendice 2.1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Il metodo U-SENS™ è una prova *in vitro* che consente di quantificare le variazioni di espressione del marcatore di superficie cellulare CD86 nella linea cellulare di linfoma istiocitico umano (cellule U937) dopo 45 ± 3 ore di esposizione alla sostanza chimica in esame. Il marcatore di superficie CD86 è un marcatore tipico dell'attivazione delle cellule U937. Si tratta di una molecola di costimolazione capace di stimolare l'attivazione monocitaria, che svolge un ruolo cruciale nel priming dei linfociti T. Le variazioni di espressione del marcatore di superficie cellulare CD86 sono misurate mediante citometria a flusso dopo colorazione cellulare, generalmente effettuata con anticorpi marcati con isotiocianato di fluorescina (FITC). In parallelo è inoltre effettuata una misurazione della citotossicità (ad esempio mediante PI) per stabilire se la sovraespressione del marcatore di superficie cellulare CD86 avviene in presenza di concentrazioni sub-citotossiche. L'indice di stimolazione (S.I.) del marcatore di superficie cellulare CD86 rispetto al controllo con solvente/disperdente è calcolato e utilizzato in un modello predittivo (cfr. il paragrafo 19) ai fini della distinzione tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA TECNICA

8. Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice relativa al metodo di prova B.71, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 2.2, conformemente alle buone pratiche per i metodi *in vitro* (11). Inoltre gli utilizzatori del metodo devono mantenere una banca dati storica contenente i dati ottenuti con i controlli di reattività (cfr. il paragrafo 11) nonché con i controlli positivi e con solvente/disperdente (cfr. i paragrafi 15-16) e utilizzare tali dati per confermare la persistenza nel tempo della riproducibilità della prova nel loro laboratorio.

PROCEDURA

9. La presente prova si basa sul protocollo U-SENS™ n. 183 del Servizio dati sui metodi alternativi alla sperimentazione animale (*DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation - DB-ALM*) (12). Nell'applicare e utilizzare la prova U-SENS™ in laboratorio vanno seguite le procedure operative standard (SOP). È possibile avvalersi di un sistema automatizzato per l'esecuzione della prova U-SENS™ purché si dimostri, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2, che tale sistema produce risultati simili. Di seguito è fornita una descrizione dei principali elementi e procedure del metodo U-SENS™.

Preparazione delle cellule

10. Per l'esecuzione del metodo U-SENS™ si utilizza la linea cellulare di linfoma istiocitico umano (cellule U937) (13). Le cellule (clone CRL1593.2) devono provenire da una banca di cellule riconosciuta, quale la *American Type Culture Collection*.
11. Le cellule U937 sono coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5 % di CO₂, su mezzo di coltura RPMI-1640 integrato da 10 % di siero fetale di vitello (FCS), 2 mM di L-glutamina, 100 unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina (mezzo completo). Le cellule U937 sono regolarmente messe in subcultura ogni 2-3 giorni a una densità di 1,5 o 3 × 10⁵ cellule/ml rispettivamente. La densità cellulare non deve superare 2 × 10⁶ cellule/ml e la vitalità cellulare misurata con esclusione del blu di tripano deve essere ≥ 90 % (questo non si applica al primo passaggio successivo allo scongelamento). Prima di essere utilizzato per la prova, ogni lotto di cellule, FCS o anticorpi deve essere qualificato mediante un controllo di reattività da realizzarsi almeno una settimana dopo lo scongelamento mediante acido picrilsulfonico (acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico: TNBS) (n. CAS 2508-19-2, purezza ≥ 99 %) come controllo positivo e acido lattico (LA) (n. CAS 50-21-5, purezza ≥ 85 %) come controllo negativo. Per il controllo di reattività devono essere testate sei concentrazioni finali per ciascuno dei due controlli (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml e LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). Il TNBS solubilizzato nel mezzo completo deve dar luogo a una risposta di CD86 positiva e correlata alla concentrazione

(ad es. quando una concentrazione positiva, S.I. $CD86 \geq 150$, è seguita da una concentrazione con S.I. $CD86$ crescente) e l'acido lattico solubilizzato nel mezzo completo deve dar luogo a una risposta negativa di $CD86$ (cfr. il paragrafo 21). Possono essere utilizzati per la prova soltanto i lotti di cellule che superano per due volte il controllo di reattività. Le cellule possono essere moltiplicate fino a sette settimane dopo lo scongelamento senza superare 21 passaggi. Il controllo di reattività va effettuato secondo le procedure descritte ai paragrafi 18-22.

12. Per la prova, le cellule U937 sono inoculate a una densità di 3×10^5 cellule/ml o di 6×10^5 cellule/ml e precoltivate in fiasche di coltura per 2 giorni o 1 giorno rispettivamente. Possono essere utilizzate condizioni di precoltura diverse da quelle descritte sopra purché si forniscano sufficienti motivazioni scientifiche e si dimostri, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2, che tali condizioni alternative producono risultati simili. Il giorno della prova le cellule raccolte dalla fiasca di coltura sono rimesse in sospensione in un nuovo mezzo di coltura a una densità di 5×10^5 cellule/ml. Quindi le cellule sono ripartite su una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti con 100 μ l (densità cellulare finale di $0,5 \times 10^5$ cellule/pozzetto).

Preparazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

13. La valutazione della solubilità è realizzata prima dell'esecuzione della prova. A questo scopo le sostanze chimiche in esame sono dissolte o disperse stabilmente a una concentrazione di 50 mg/ml utilizzando di preferenza come solvente il mezzo completo o, se la sostanza chimica in esame non è solubile nel mezzo completo, dimetilsolfossido (DMSO, purezza ≥ 99 %) come seconda scelta di solvente/disperdente. Per la prova, la sostanza chimica in esame è disciolta fino a una concentrazione finale di 0,4 mg/ml nel mezzo completo, se la sostanza è solubile in tale solvente/disperdente. Se è solubile unicamente in DMSO, la sostanza chimica è disciolta a una concentrazione di 50 mg/ml. È possibile utilizzare solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli descritti sopra fornendo una sufficiente giustificazione scientifica. Si deve tenere conto della stabilità della sostanza chimica in esame nel solvente/disperdente finale.
14. Le sostanze chimiche in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Poiché non viene effettuata una prova di determinazione della dose, per la prima batteria di prove vengono testate 6 concentrazioni finali (1, 10, 20, 50, 100 e 200 μ g/ml) nel corrispondente solvente/disperdente, vale a dire mezzo completo o DMSO a 0,4 % nel mezzo. Per le batterie di prove successive, a partire dalle soluzioni delle sostanze chimiche in esame alla concentrazione di 0,4 mg/ml nel mezzo completo o 50 mg/ml in DMSO vengono preparate almeno 4 soluzioni di lavoro (cioè almeno 4 concentrazioni) con il solvente/disperdente corrispondente. Le soluzioni di lavoro sono infine utilizzate per il trattamento aggiungendo un volume uguale di sospensione di cellule U937 (cfr. il

paragrafo 11 *supra*) al volume della soluzione di lavoro nella piastra per ottenere un'ulteriore diluizione di fattore 2 (12). Le concentrazioni (almeno 4) per eventuali batterie di prove supplementari sono scelte sulla base dei risultati individuali di tutte le batterie di prove precedenti (8). Le concentrazioni finali utilizzabili sono 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg/ml. La concentrazione finale massima è 200 µg/ml. Se si ottiene un valore positivo per CD86 a 1 µg/ml, si valuta 0,1 µg/ml per trovare la concentrazione della sostanza chimica in esame che non supera la soglia di positività per CD86. Per ogni batteria di prove si calcola il valore EC150 (concentrazione alla quale la sostanza chimica raggiunge la soglia di positività di 150 % per CD86 - cfr. il paragrafo 19) se per CD86 si osserva una risposta positiva correlata alla concentrazione. Se la sostanza chimica in esame induce una risposta positiva per CD86 non correlata alla concentrazione, il calcolo del valore EC150 potrebbe non essere pertinente, come descritto nel protocollo U-SENS™ n. 183 del DB-ALM (12). Per ogni batteria di prove si calcola il valore CV70 (concentrazione alla quale la sostanza chimica raggiunge la soglia di citotossicità di 70 % - cfr. il paragrafo 19) ogniqualvolta possibile. Per valutare l'effetto della risposta correlata alla concentrazione dell'aumento di CD86, tutte le concentrazioni scelte tra quelle utilizzabili devono essere uniformemente ripartite tra EC150 (o la massima concentrazione non citotossica negativa per CD86) e CV70 (o la massima concentrazione consentita, vale a dire 200 µg/ml). Devono essere testate almeno 4 concentrazioni per batteria di prove, di cui almeno 2 comuni alla o alle batterie di prove precedenti, a fini di raffronto.

15. Il controllo con solvente/disperdente utilizzato nel metodo U-SENS™ è il mezzo completo [per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente (cfr. il paragrafo 4)] o DMSO a 0,4 % nel mezzo completo (per le sostanze chimiche in esame solubilizzate o disperse stabilmente in DMSO).
16. Il controllo positivo utilizzato nel metodo U-SENS™ è il TNBS (cfr. il paragrafo 11), preparato in mezzo completo. Il TNBS deve essere utilizzato come controllo positivo per la misurazione dell'espressione di CD86 a una concentrazione finale unica nella piastra (50 µg/ml) che produce una vitalità cellulare > 70 %. Per ottenere una concentrazione di 50 µg/ml di TNBS nella piastra si prepara una soluzione madre di TNBS a 1 M (cioè 293 mg/ml) in mezzo completo e la si diluisce ulteriormente di un fattore 2930 nel mezzo completo fino ad ottenere una soluzione di lavoro di 100 µg/ml. L'acido lattico (LA, CAS 50-21-5) è utilizzato come controllo negativo a 200 µg/ml, solubilizzato in mezzo completo (a partire da una soluzione madre di 0,4 mg/ml). Per ogni piastra di ciascuna batteria di prove si preparano tre repliche di controllo con mezzo completo non trattato, controllo con solvente/disperdente, controlli negativo e positivo (12). Altri controlli positivi adeguati possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la batteria di prove. I criteri di accettabilità

della batteria di prove sono identici a quelli descritti per la sostanza chimica in esame (cfr. il paragrafo 12).

Applicazione delle sostanze chimiche in esame e delle sostanze di controllo

17. Il controllo con solvente/disperdente o le soluzioni di lavoro descritte ai paragrafi 14-16 sono mescolati nella proporzione 1:1 (v/v) con le sospensioni cellulari preparate nella piastra a fondo piatto a 96 pozzetti (cfr. il paragrafo 12). Le piastre trattate sono quindi messe in incubazione per 45 ± 3 ore a una temperatura di $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con 5 % di CO_2 . Prima dell'incubazione le piastre sono sigillate con una membrana semipermeabile al fine di evitare l'evaporazione di sostanze chimiche volatili e la contaminazione incrociata tra le cellule trattate con le sostanze chimiche in esame (12).

Colorazione cellulare

18. Dopo 45 ± 3 ore di esposizione le cellule sono trasferite in una piastra per microtitolazione con fondo a V e raccolte mediante centrifugazione. L'interferenza di solubilità è definita dalla presenza di cristalli o gocce visibili al microscopio 45 ± 3 ore dopo il trattamento (prima della colorazione cellulare). I supernatanti vengono scartati e le cellule rimanenti sono lavate una volta con 100 μl di tampone fosfato salino (PBS) ghiacciato contenente 5 % di siero fetale di vitello (tampone di colorazione). Dopo la centrifugazione le cellule sono rimesse in sospensione in 100 μl di tampone di colorazione e colorate con 5 μl (cioè 0,25 μg) di anticorpi anti-CD86 o anticorpi murini IgG1 (isotipo) marcati con FITC a 4°C per 30 minuti al riparo dalla luce. Devono essere utilizzati gli anticorpi descritti nel protocollo U-SENS™ n. 183 del DB-ALM (12) (per CD86: BD-PharMingen #555657 Clone: Fun-1, o Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; e per IgG1: BD-PharMingen #555748, o Caltag/Invitrogen # GM4992). Sulla base dell'esperienza degli sviluppatori del metodo di prova, l'intensità di fluorescenza dei vari lotti di anticorpi è generalmente costante. Per la prova possono essere usati altri cloni o fornitori di anticorpi che abbiano superato il controllo di reattività (cfr. il paragrafo 11). Tuttavia gli utilizzatori possono decidere di effettuare la titolazione degli anticorpi nelle loro condizioni di laboratorio per definire la concentrazione più adatta all'uso. È possibile avvalersi di altri sistemi di rilevazione, quali anticorpi marcati con fluorocromo anti-CD86, purché si possa dimostrare che essi producono risultati simili agli anticorpi coniugati con FITC, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2. Dopo due lavaggi con 100 μl di tampone di colorazione e un lavaggio con 100 μl di PBS ghiacciato, le cellule sono rimesse in sospensione in PBS ghiacciato (ad es. 125 μl per i campioni analizzati manualmente provetta per provetta o 50 μl se si utilizza un autocampionatore) ed è aggiunta una soluzione di PI (concentrazione finale di 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). È possibile utilizzare altri marcatori di citotossicità, tra cui la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e il blu di tripano,

purché si dimostri che tali coloranti alternativi producono risultati simili al PI, ad esempio testando le sostanze di riferimento di cui all'appendice 2.2.

Analisi mediante citometria a flusso

19. Il livello di espressione di CD86 e la vitalità cellulare sono analizzati mediante citometria a flusso. Le cellule sono rappresentate su un grafico a punti in scala logaritmica in base alla taglia (FSC) e alla granularità (SSC) per identificare chiaramente la popolazione in un primo gate R1 ed eliminare i residui. L'obiettivo è acquisire un totale di 10 000 cellule nel gate R1 per ogni pozzetto. Le cellule appartenenti allo stesso gate R1 sono rappresentate su un grafico a punti FL3 o FL4/SSC. Le cellule vitali sono identificate tracciando un secondo gate R2 di selezione della popolazione cellulare negativa per lo ioduro di propidio (canale FL3 o FL4). La vitalità cellulare può essere calcolata dal programma di analisi del citometro mediante l'equazione riportata di seguito. Se la vitalità cellulare è bassa possono essere raccolte fino a 20 000 cellule, comprese le cellule morte. Un'opzione alternativa consiste nell'acquisire i dati per un minuto dall'inizio dell'analisi.

$$\text{Vitalità cellulare} = \frac{\text{Numero di cellule vive}}{\text{Numero totale di cellule analizzate}} \times 100$$

Si misura quindi la percentuale di cellule FL1-positive tra le cellule vitali comprese nel gate R2 (all'interno di R1). L'espressione di CD86 sulla superficie cellulare è analizzata mediante un grafico a punti FL1/SSC limitato alle cellule vitali (R2).

Per i pozzetti contenenti mezzo completo/IgG1 il marcatore di analisi è fissato in prossimità della popolazione principale in modo che i controlli con mezzo completo presentino un valore IgG1 compreso tra 0,6 e 0,9 %.

L'interferenza di colore è definita come scostamento della dispersione corrispondente agli IgG1 marcati con FITC (media geometrica di S.I. IgG1 FL1 \geq 150 %).

L'indice di stimolazione (S.I.) di CD86 per le cellule di controllo (non trattate o in DMSO a 0,4 %) e per le cellule trattate con la sostanza chimica è calcolato mediante la seguente equazione:

$$S.I. = \frac{\% \text{ di cellule trattate con } CD86^+ - \% \text{ di cellule trattate con } IgG1^+}{\% \text{ di cellule di controllo } CD86^+ - \% \text{ di cellule di controllo } IgG1^+} \times 100$$

% di cellule di controllo non trattate IgG1⁺: percentuale di cellule IgG1 FL1-positive che superano il marcatore di analisi (intervallo di accettabilità \geq 0,6 % e $<$ 1,5 %, cfr. il paragrafo 22) tra le cellule vitali non trattate.

% di cellule di controllo IgG1⁺/cellule trattate CD86⁺: percentuale di cellule IgG1/CD86 FL1-positive misurata senza spostare il marcatore di analisi, tra le cellule vitali di controllo/cellule trattate.

DATI E RELAZIONI

Valutazione dei dati

20. I seguenti parametri sono calcolati con il metodo U-SENS™: il valore CV70, vale a dire la concentrazione che produce il 70 % di sopravvivenza di cellule U937 (30 % di citotossicità), e il valore EC150, vale a dire la concentrazione alla quale le sostanze chimiche in esame producono un indice di stimolazione (S.I.) di CD86 di 150 %.

Il valore CV70 è calcolato per interpolazione log-lineare mediante la seguente equazione:

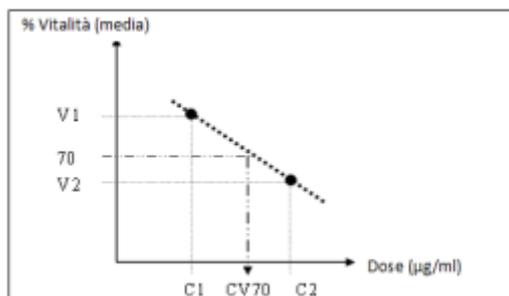
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

in cui:

V1 è il valore minimo di vitalità cellulare superiore a 70 %

V2 il valore massimo di vitalità cellulare inferiore a 70 %

C1 e C2 sono le concentrazioni che producono rispettivamente i valori di vitalità cellulare V1 e V2.



È possibile utilizzare altri metodi per calcolare il valore CV70, purché sia provato che ciò non incide sui risultati (ad es. testando le sostanze di riferimento).

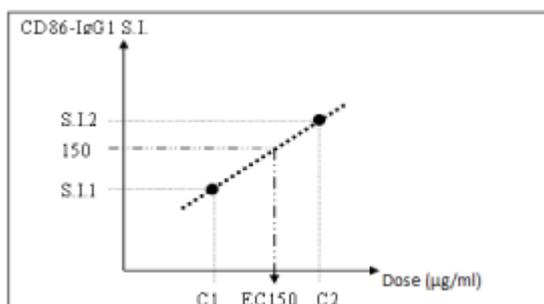
Il valore EC150 è calcolato per interpolazione log-lineare mediante la seguente equazione:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

in cui:

C1 è la concentrazione più elevata in µg/ml con S.I. CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 è la concentrazione più bassa in µg/ml con S.I. CD86 ≥ 150 % (S.I. 2)



I valori EC150 e CV70 sono calcolati

- per ogni batteria di prove: i valori individuali EC150 e CV70 sono utilizzati per valutare l'effetto della risposta correlata alla concentrazione dell'aumento di CD86 (cfr. il paragrafo 14),
- il valore CV70 globale è determinato in funzione della vitalità media (12),
- il valore EC150 globale di una sostanza chimica in esame la cui predizione è risultata POSITIVA con il metodo U-SENSTM è determinato in funzione dei valori medi di S.I. di CD86 (cfr. il paragrafo 21) (12).

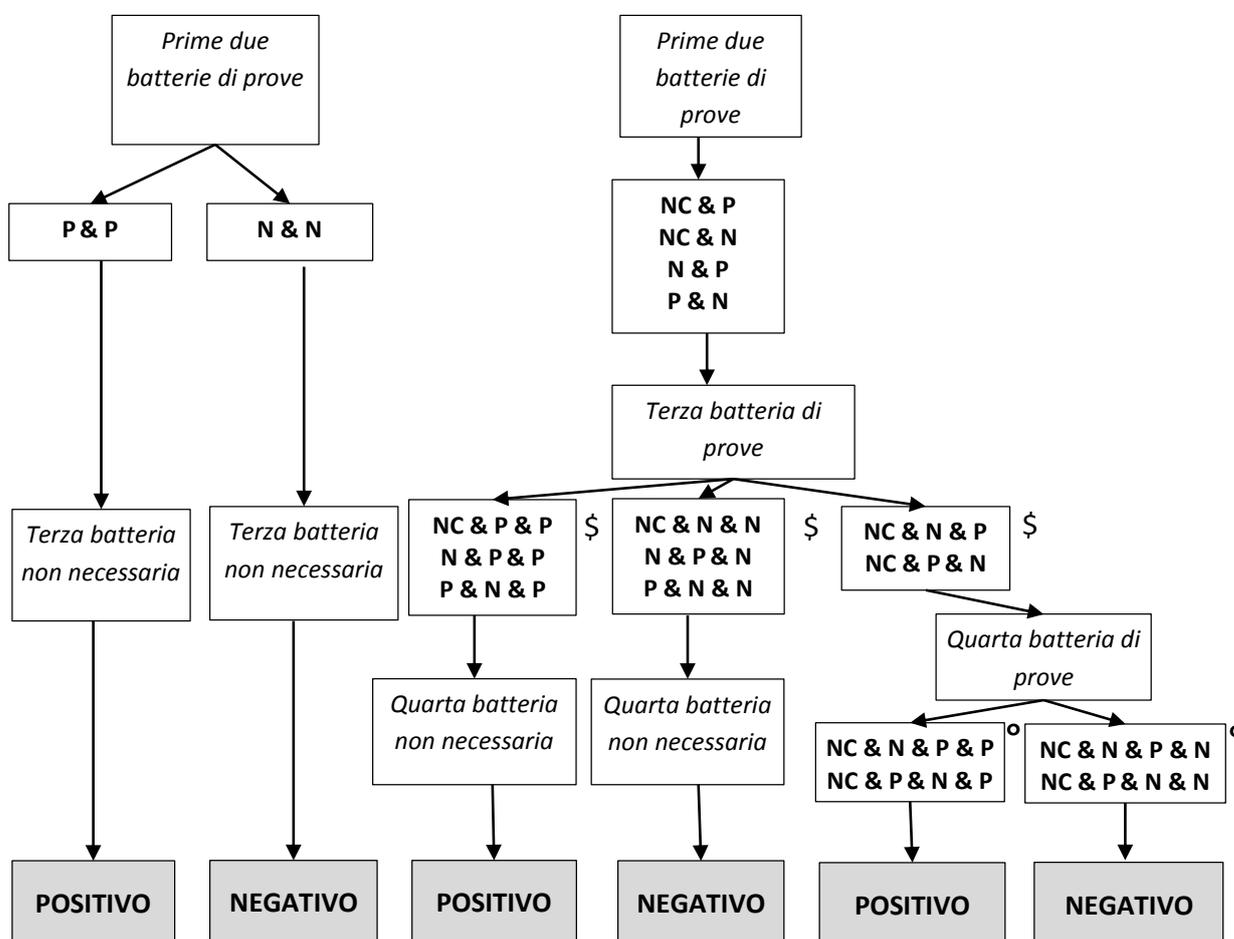
Modello predittivo

21. Per la misurazione dell'espressione di CD86 ciascuna sostanza chimica è testata in almeno quattro concentrazioni e in almeno due batterie di prove indipendenti (realizzate in giorni diversi) per ottenere una predizione unica (POSITIVA o NEGATIVA).

- La conclusione individuale di una batteria di prove U-SENSTM è considerata negativa (di seguito, N) se l'S.I. di CD86 è inferiore a 150 % a tutte le concentrazioni non citotossiche (vitalità cellulare ≥ 70 %) e se non è stata osservata alcuna interferenza (citotossicità, solubilità: cfr. il paragrafo 18 o colore: cfr. il paragrafo 19, a prescindere dalle concentrazioni non citotossiche a cui è osservata l'interferenza). In tutti gli altri casi: se l'S.I. di CD86 è superiore o uguale a 150 % e/o si osservano interferenze, la conclusione individuale di una batteria di prove U-SENSTM è considerata positiva (di seguito, P).
- Una predizione U-SENSTM è considerata NEGATIVA se almeno due batterie di prove indipendenti sono negative (N) (figura 1). Se le prime due batterie di prove sono negative (N), la predizione U-SENSTM è considerata NEGATIVA e non è necessario eseguire una terza batteria di prove.
- Una predizione U-SENSTM è considerata POSITIVA se almeno due batterie di prove indipendenti sono positive (P) (figura 1). Se le prime due batterie di prove sono positive (P), la predizione U-SENSTM è considerata POSITIVA e non è necessario eseguire una terza batteria di prove.

- Poiché non viene effettuata una prova di determinazione della dose, si ha un'eccezione se, nella prima batteria di prove, l'S.I. di CD86 è superiore o uguale a 150 % unicamente alla massima concentrazione citotossica. La batteria di prove è considerata NON CONCLUSIVA (NC) e si testano altre concentrazioni (tra la massima concentrazione non citotossica e la minima concentrazione citotossica - cfr. il paragrafo 20) in ulteriori batterie di prove. Se la batteria di prove risulta NC si svolgono almeno due batterie di prove supplementari; una quarta batteria di prove è svolta in caso di discordanza tra le batterie di prove 2 e 3 (N e/o P in qualunque combinazione) (figura 1). Le batterie di prove successive saranno considerate positive anche nel caso in cui soltanto una delle concentrazioni non citotossiche dia luogo a un valore di CD86 uguale o superiore a 150 %, dal momento che i parametri di concentrazione sono stati specificamente adattati alla sostanza chimica in esame. La predizione finale sarà basata sul risultato ottenuto nella maggioranza delle tre o quattro batterie di prove individuali (cioè 2 su 3 o 2 su 4) (figura 1).

Figura 1: Modello predittivo utilizzato nel metodo U-SENS™. Una previsione U-SENS™ va considerata nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni del paragrafo 4 e dei paragrafi 7, 8 e 9 dell'Introduzione generale.



N: batteria di prove senza risultato positivo per CD86 né interferenza;

P: batteria di prove con risultato positivo per CD86 e/o interferenza/interferenze;

NC: non conclusiva. Prima batteria di prove non conclusiva se CD86 è positivo unicamente alla massima concentrazione non citotossica;

#: un risultato individuale non conclusivo (NC) attribuito unicamente alla prima batteria di prove comporta automaticamente la necessità di una terza batteria di prove per raggiungere una maggioranza di risultati positivi (P) o negativi (N) in almeno 2 batterie di prove indipendenti su 3.

§: i riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime tre batterie di prove sulla base dei risultati ottenuti nelle prime due batterie di prove (riportati nel riquadro che precede).

°: i riquadri mostrano le combinazioni pertinenti di risultati delle prime quattro batterie di prove sulla base dei risultati ottenuti nelle prime tre batterie di prove (riportati nel riquadro che precede).

Criteria di accettabilità

22. I seguenti criteri di accettabilità devono essere soddisfatti quando si utilizza il metodo di prova U-SENS™ (12).

- Al termine di un periodo di esposizione di 45 ± 3 ore la vitalità media delle tre repliche di cellule U937 non trattate deve essere $> 90 \%$ e non deve essere osservato alcuno scostamento dell'espressione di CD86. L'espressione basale di CD86 nelle cellule U937 non trattate deve essere compresa tra $\geq 2 \%$ e $\leq 25 \%$.
- Se il solvente utilizzato è il DMSO, la sua validità come controllo con mezzo disperdente è valutata calcolando l'S.I. del DMSO rispetto a quello delle cellule non trattate, e la vitalità media delle tre repliche di cellule deve essere $> 90 \%$. Il controllo con mezzo disperdente DMSO è valido se l'S.I. medio per CD86 nelle tre repliche è inferiore a 250% dell'S.I. medio di CD86 nelle tre repliche di cellule U937 non trattate.
- Le batterie di prove sono considerate valide se almeno due dei tre valori IgG1 delle cellule U937 non trattate sono compresi tra $\geq 0,6 \%$ e $< 1,5 \%$.
- Il controllo negativo testato in parallelo (acido lattico) è considerato valido se almeno due delle tre repliche sono negative (S.I. CD86 $< 150 \%$) e non citotossiche (vitalità cellulare $\geq 70 \%$).
- Il controllo positivo (TNBS) è considerato valido se almeno due delle tre repliche sono positive (S.I. CD86 $\geq 150 \%$) e non citotossiche (vitalità cellulare $\geq 70 \%$).

Relazione sulla prova

23. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostruente:

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- aspetto fisico, solubilità nel mezzo completo, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Sostanza multicomponente, UVCB o miscela:

- caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), la purezza, le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;
- aspetto fisico, solubilità nel mezzo completo, solubilità nel DMSO e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, a seconda dei dati disponibili;
- peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Controlli

Controllo positivo

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- aspetto fisico, solubilità nel DMSO, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.

Controllo negativo e controllo con solvente/disperdente

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;

- aspetto fisico, peso molecolare e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati solventi/mezzi disperdenti diversi da quelli menzionati nelle linee guida e se disponibili;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni di prova

- nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;
- descrizione del sistema di prova utilizzato;
- linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);
- tipo di citometria a flusso utilizzato (ad es. modello), comprese le impostazioni dello strumento, anticorpi e marcatore di citotossicità utilizzati;
- procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'esecuzione della prova mediante sostanze di riferimento o nel dimostrare la riproducibilità della prova nel tempo, ad esempio dati storici dei controlli e/o dei controlli di reattività.

Criteri di accettabilità della prova

- vitalità cellulare e valori S.I. CD86 ottenuti con il controllo con solvente/disperdente rispetto agli intervalli di accettabilità;
- vitalità cellulare e valori S.I. ottenuti con il controllo positivo rispetto agli intervalli di accettabilità;
- vitalità cellulare di tutte le concentrazioni testate della sostanza chimica in esame.

Procedura

- numero di prove realizzate;
- concentrazioni della sostanza chimica in esame, applicazione e tempo di esposizione (se diverso da quello raccomandato);
- durata dell'esposizione;
- descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;
- descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

- presentazione dei dati in formato tabulare, ivi compreso CV70 (se del caso), S.I., valori di vitalità cellulare, valori EC150 (se del caso) ottenuti per la sostanza chimica in esame e per il controllo positivo in ciascuna batteria di prove, e indicazione della classificazione della sostanza chimica in esame secondo il modello predittivo;
- descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

- discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova U-SENS™;
- esame dei risultati della prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Consultabile al seguente indirizzo: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Consultabile al seguente indirizzo: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Consultabile al seguente indirizzo: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kollé, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Consultabile al seguente indirizzo: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Consultabile al seguente indirizzo: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Consultabile al seguente indirizzo: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Appendice 2.1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con la prova e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza della prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza", per indicare la proporzione di risultati corretti di una prova (14).

AOP (*Adverse Outcome Pathway, meccanismo d'azione degli effetti avversi*): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso *in vivo* (15).

Risposta di CD86 indotta dalla concentrazione: si ha dipendenza dalla concentrazione (o risposta indotta dalla concentrazione) quando una concentrazione che induce una risposta positiva (I.S. $CD86 \geq 150$) è seguita da una concentrazione con un I.S. CD86 crescente.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV70: concentrazione stimata che presenta una vitalità cellulare del 70 %.

Deriva: i) il valore corretto %CD86⁺ della replica 3 del controllo non trattato è inferiore a 50 % della media corretta del valore %CD86⁺ delle repliche 1 e 2 del controllo non trattato; e ii) il valore corretto %CD86⁺ della replica 3 del controllo negativo è inferiore a 50 % della media corretta del valore %CD86⁺ delle repliche 1 e 2 del controllo negativo.

EC150: concentrazioni stimate che producono un I.S. di 150 % di espressione di CD86.

Citometria a flusso: tecnica citometrica in cui le cellule sospese in un fluido passano velocemente e singolarmente attraverso un fascio luminoso di eccitazione, producendo schemi di diffusione della luce che sono caratteristici delle cellule e dei loro componenti; le cellule sono spesso marcate con marcatori fluorescenti di modo che la luce sia dapprima assorbita e quindi emessa a un'altra frequenza.

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

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment, approcci integrati in materia di prove e valutazioni*): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

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

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

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

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

Preapteni: sostanze chimiche che diventano sensibilizzanti tramite trasformazione abiotica, ad es. l'ossidazione.

Proapteni: sostanze chimiche che necessitano di una bioattivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto ricercato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (14).

Affidabilità: misura in cui una prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (14).

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

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (14).

S.I.: indice di stimolazione. Valore relativo della media geometrica dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle cellule esposte alla sostanza chimica in esame confrontato con l'MFI di cellule trattate con solvente/disperdente.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente/disperdente utilizzato. È utilizzato per stabilire la risposta di base per i campioni

trattati con la sostanza chimica in esame disciolta o in dispersione stabile nello stesso solvente/disperdente. Se testato in concomitanza con un controllo con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (14).

Tampone di colorazione: tampone fosfato salino contenente 5 % di siero fetale di vitello.

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

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

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (16).

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

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo (14).

Appendice 2.2

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice per il metodo di prova B.71, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo correttamente la predizione attesa con il metodo U-SENS™ per le 10 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori CV70 e EC150 che rientrino nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 10 sostanze di riferimento. Tali sostanze sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte per quanto riguarda i pericoli di sensibilizzazione cutanea. Altri criteri di selezione riguardavano la disponibilità in commercio delle sostanze e la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* e di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo U-SENS™. Sono inoltre disponibili dati di riferimento pubblicati per il metodo U-SENS™ (1) (8).

Tabella 1: Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il metodo di prova U-SENS™

Sostanze di prova per la verifica della competenza	N. CAS	Stato fisico	Predizione <i>in vivo</i> ¹	U-SENS™ Solvente/ disperdente	U-SENS™ Intervallo di riferimento CV70 in µg/ml ²	U-SENS™ Intervallo di riferimento EC150 in µg/ml ²
4-Fenilendiammina	106-50-3	Solido	Sensibilizzante (elevato)	Mezzo completo ³	<30	Positivo (≤10)
Acido picrilsulfonico	2508-19-2	Liquido	Sensibilizzante (elevato)	Mezzo completo	>50	Positivo (≤50)
Maleato di dietile	141-05-9	Liquido	Sensibilizzante (moderato)	DMSO	10-100	Positivo (≤20)
Resorcinolo	108-46-3	Solido	Sensibilizzante (moderato)	Mezzo completo	>100	Positivo (≤50)
Alcol cinnamico	104-54-1	Solido	Sensibilizzante (debole)	DMSO	>100	Positivo (10-100)
4-Allilanisolo	140-67-0	Liquido	Sensibilizzante (debole)	DMSO	>100	Positivo (<200)
Saccarina	81-07-2	Solido	Non sensibilizzante	DMSO	>200	Negativo (>200)
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Non sensibilizzante	Mezzo completo	>200	Negativo (>200)
Acido lattico	50-21-5	Liquido	Non sensibilizzante	Mezzo completo	>200	Negativo (>200)
Acido salicilico	69-72-7	Solido	Non sensibilizzante	DMSO	>200	Negativo (>200)

Abbreviazioni: N.CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione)

nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).

¹ La predizione *in vivo* del pericolo (e della potenza) è basata su dati LLNA (1) (8). La potenza *in vivo* è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (17).

² Sulla base dei dati storici osservati (1) (8).

³ Mezzo completo: mezzo di coltura RPMI-1640 integrato da 10 % di siero fetale di vitello, 2 mM di L-glutamina, 100 unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (8).

Appendice 3

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO*: METODO DI PROVA IL-8 LUC

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

1. Contrariamente ai metodi di prova che analizzano l'espressione di marcatori di superficie cellulare, il metodo di prova IL8-Luc quantifica le variazioni dell'espressione di IL-8, una citotossina associata all'attivazione di cellule dendritiche (DC). Nella linea cellulare reporter IL-8 derivata dalla linea cellulare THP-1 (THP-G8, stabilita dalla linea cellulare di leucemia monocitica acuta umana THP-1), l'espressione di IL-8 è misurata in seguito all'esposizione a sensibilizzanti (1). Il livello di espressione della luciferasi è quindi utilizzato per contribuire a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei.
2. Il metodo di prova IL-8 Luc è stato oggetto di uno studio di validazione (2) condotto dal Centro giapponese di validazione di metodi alternativi (JaCVAM), dal **ministero dell'Economia, del commercio e dell'industria** (METI) e dalla Società giapponese **per i metodi alternativi alla sperimentazione animale (JSAAE)**, cui ha fatto seguito una revisione indipendente *inter pares* (3) sotto la guida del JaCVAM e del ministero della Salute, del lavoro e della sicurezza sociale (MHLW) con il sostegno della **Cooperazione internazionale relativa ai metodi alternativi alla sperimentazione animale (ICATM)**. Tenuto conto di tutti i dati disponibili e dei pareri formulati dalle autorità di regolamentazione e dai portatori di interessi, si ritiene che il metodo di prova IL-8 Luc possa efficacemente contribuire, nell'ambito di una metodologia integrata di tipo IATA, a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei a fini di classificazione ed etichettatura del pericolo. In letteratura figurano esempi dell'uso dei dati del metodo di prova IL-8 Luc in combinazione con altre informazioni (4) (5) (6).
3. È stato dimostrato che il metodo di prova IL-8 Luc può essere applicato in laboratori con esperienza di coltura cellulare e misurazione della luciferasi. Il livello di riproducibilità era dell'ordine dell'87,7 % all'interno dello stesso laboratorio e dell'87,5 % fra laboratori diversi (2). I dati ottenuti nello studio di valutazione (2) e in altri studi pubblicati (1) (6) indicano che, rispetto all'LLNA, il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di ottenere una predizione positiva o negativa per 118 sostanze chimiche su 143 e ha fornito risultati non conclusivi per 25 sostanze; l'accuratezza del metodo IL-8 Luc nella distinzione tra sensibilizzanti (categoria 1 del GHS dell'ONU/CLP) e non sensibilizzanti cutanei ("senza categoria" del GHS dell'ONU/CLP) è dell'86 % (101/118), con una sensibilità del 96 % (92/96) e una specificità del 41 % (9/22). Se non si tiene conto delle sostanze chimiche che esulano dall'ambito di applicabilità descritto di seguito (paragrafo 5), il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di classificare 113 sostanze chimiche su 136 come positive o

negative e 23 sostanze come non conclusive; l'accuratezza del metodo IL-8 Luc è dell'ordine dell'89 % (101/113), con una sensibilità del 96 % (92/96) e una specificità del 53 % (9/17). Se ci si avvale dei dati relativi all'uomo citati in Urbisch *et al.* (7), il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di classificare 76 sostanze chimiche su 90 come positive o negative e 14 sostanze come non conclusive; l'accuratezza dell'IL-8 Luc è dell'ordine dell'80 % (61/76), con una sensibilità del 93 % (54/58) e una specificità del 39 % (7/18). Se non si tiene conto delle sostanze chimiche che esulano dall'ambito di applicabilità, il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di classificare 71 sostanze chimiche su 84 come positive o negative e 13 sostanze come non conclusive; l'accuratezza dell'IL-8 Luc è dell'ordine dell'86 % (61/71), con una sensibilità del 93 % (54/58) e una specificità del 54 % (7/13). È probabile che i falsi negativi nelle predizioni formulate con il metodo di prova IL-8 Luc riguardino piuttosto le sostanze chimiche con una potenza di sensibilizzazione cutanea da bassa a moderata (sottocategoria 1B del GHS dell'ONU/CLP) rispetto alle sostanze chimiche con una potenza elevata (sottocategoria 1A del GHS dell'ONU/CLP) (6). L'insieme di queste informazioni indica che l'IL-8 Luc può efficacemente contribuire all'identificazione del pericolo di sensibilizzazione cutanea. I valori di accuratezza forniti per il metodo di prova IL-8 Luc utilizzato isolatamente sono puramente indicativi, in quanto la prova dovrebbe essere considerata in combinazione con altre fonti di informazione nell'ambito di un approccio IATA e in conformità alle disposizioni dei paragrafi 7 e 8 dell'Introduzione generale. Inoltre, nel valutare le prove di sensibilizzazione cutanea che non utilizzano la sperimentazione animale si deve tenere presente che l'LLNA, come pure altre prove che utilizzano la sperimentazione animale, può non riflettere pienamente la situazione per l'uomo.

4. I dati attualmente disponibili indicano che il metodo di prova IL-8 Luc è applicabile alle sostanze chimiche in esame relative a diversi gruppi funzionali organici, meccanismi di reazione, potenze di sensibilizzazione cutanea (determinate negli studi *in vivo*) e proprietà fisico-chimiche (2)(6).
5. Nonostante utilizzi il solvente X-VIVO™ 15, il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di valutare correttamente sostanze chimiche con un $\text{Log } K_{ow} > 3,5$ e sostanze con un grado di idrosolubilità di circa 100 µg/ml calcolato con il programma EPI Suite™ e la sua efficienza nell'individuare sensibilizzanti scarsamente idrosolubili è superiore a quella del metodo di prova IL-8 Luc realizzato con il solvente dimetilsolfossido (DMSO) (2). Tuttavia, i risultati negativi ottenuti con sostanze chimiche in esame che non vengono disciolte a 20 mg/ml possono dar luogo a falsi negativi, in quanto le sostanze non sono solubili in X-VIVO™ 15. Per tali sostanze chimiche, quindi, non si devono prendere in considerazione risultati negativi. Nell'ambito dello studio di validazione si è osservato un tasso elevato di falsi negativi per le anidridi. Inoltre, a causa della capacità metabolica limitata della linea cellulare utilizzata (8) e delle condizioni sperimentali, i proapteni

(sostanze che richiedono un'attivazione enzimatica) e i preaptenti (sostanze attivate mediante ossidazione) possono dare risultati negativi nella prova. Tuttavia, anche se i risultati negativi ottenuti con potenziali pre/proaptenti devono essere interpretati con cautela, va osservato che il metodo di prova IL-8 Luc ha permesso di identificare correttamente 11 preaptenti su 11, 6 proaptenti su 6 e 6 pre/proaptenti su 8 nella serie di dati dell'IL-8 Luc (2). L'esame globale recentemente effettuato su tre metodi di prova che non comportano l'impiego di animali (DPRA, KeratinoSens™ e h-CLAT) per l'individuazione di preaptenti e proaptenti (9) e il fatto che le cellule THP-G8 utilizzate nel metodo di prova IL-8 Luc sono una linea cellulare derivata dalla linea THP-1 che è utilizzata nell'h-CLAT, consentono di concludere che l'IL-8 Luc, in combinazione con altri metodi, può inoltre contribuire a migliorare la sensibilità delle prove senza l'impiego di animali nell'individuazione di pre- e proaptenti. I tensioattivi testati fino ad oggi hanno dato risultati (falsi) positivi a prescindere dal tipo (cationici, anionici o non-ionici). Infine, le sostanze chimiche che interferiscono con la luciferasi possono alterarne l'attività/misurazione, provocando un'inibizione apparente o una maggiore luminescenza (10). Ad esempio, è stato segnalato che concentrazioni di fitoestrogeni superiori a 1 µM interferirebbero con i segnali di luminescenza in altri metodi di prova con geni reporter basati sulla luciferasi a causa della sovrattivazione del gene reporter della luciferasi. Di conseguenza, è necessario esaminare attentamente l'espressione della luciferasi ottenuta in presenza di concentrazioni elevate di fitoestrogeni o di composti sospettati di indurre un'attivazione del gene reporter della luciferasi comparabile a quella causata dai fitoestrogeni (11). Sulla base di quanto precede, i tensioattivi, le anidridi e le sostanze chimiche che interferiscono con la luciferasi non rientrano nel campo di applicabilità del presente metodo di prova. Nel caso in cui si dimostri che il metodo di prova IL-8 Luc non è applicabile ad altre categorie specifiche di sostanze chimiche in esame, è opportuno evitare di utilizzare tale protocollo per tali categorie.

6. Come già precisato, il metodo di prova IL-8 Luc aiuta a distinguere tra sensibilizzanti e non sensibilizzanti cutanei. Sono necessarie ulteriori ricerche, di preferenza basate su dati relativi all'uomo, per determinare se i risultati del protocollo IL-8 Luc possano contribuire, insieme ad altre fonti di informazione, alla valutazione della potenza di sensibilizzazione.
7. Le definizioni figurano nell'appendice 3.1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

8. Il metodo di prova IL-8 Luc si avvale di una linea cellulare di leucemia monocitica umana THP-1 proveniente dall'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA). A partire da questa linea cellulare il dipartimento di dermatologia della facoltà di medicina dell'università di Tohoku ha sviluppato la linea THP-G8, una linea cellulare reporter IL-8

derivata dalla THP-1 che contiene i geni della luciferasi arancione (*Stable Luciferase Orange*, SLO) e della luciferasi rossa (*Stable Luciferase Red*, SLR) sotto il controllo dei promotori dell'IL-8 e della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) rispettivamente (1). Questo sistema consente di quantificare l'induzione del gene della luciferasi rilevando la luminescenza emessa da substrati di luciferasi che producono una luminescenza soddisfacente come indicatore dell'attività di IL-8 e della GAPDH nelle cellule in seguito all'esposizione a sostanze sensibilizzanti.

9. Il sistema di prova bicromatico comprende una luciferasi che emette luce arancione (SLO; $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) (12) per l'espressione genica del promotore IL-8 e una luciferasi che emette luce rossa (SLR; $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) (13) per l'espressione genica del promotore del controllo interno, GAPDH. Le due luciferasi emettono colori diversi quando reagiscono con la d-luciferina di lucciola e la loro luminescenza è misurata simultaneamente in una reazione a fase singola dividendo la luce emessa dalla miscela di prova mediante un filtro ottico (14) (appendice 3.2).
10. Le cellule THP-G8 sono trattate per 16 ore con la sostanza chimica in esame, quindi si misura l'attività della luciferasi SLO (SLO-LA), indice dell'attività del promotore IL-8, e l'attività della luciferasi SLR (SLR-LA), indice dell'attività del promotore GAPDH. Per facilitare la comprensione delle abbreviazioni, SLO-LA e SLR-LA sono indicate rispettivamente come IL8LA e GAPLA. Nella tabella 1 figura una descrizione dei termini associati all'attività della luciferasi nel metodo di prova IL-8 Luc. I valori misurati sono utilizzati per calcolare l'IL8LA normalizzata (nIL8LA), che è il rapporto IL8LA/GAPLA, l'induzione di nIL8LA (Ind-IL8LA), che è il rapporto tra la media aritmetica dei quattro valori misurati di nIL8LA delle cellule THP-G8 trattate con una sostanza chimica in esame e i valori di nIL8LA delle cellule THP-G8 non trattate, e l'inibizione di GAPLA (Inh-GAPLA), che è il rapporto tra la media aritmetica dei quattro valori misurati di GAPLA delle cellule THP-G8 trattate con una sostanza chimica in esame e i valori di GAPLA delle cellule THP-G8 non trattate, e che è utilizzata come indicatore di citotossicità.

Tabella 1: Descrizione dei termini associati all'attività della luciferasi nel metodo di prova IL-8 Luc.

Abbreviazioni	Definizione
GAPLA	Attività della luciferasi SLR indicativa dell'attività del promotore GAPDH
IL8LA	Attività della luciferasi SLO indicativa dell'attività del promotore IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA delle cellule THP-G8 trattate con le sostanze chimiche / nIL8LA delle cellule non trattate
Inh-GAPLA	GAPLA delle cellule THP-G8 trattate con le sostanze chimiche /GAPLA delle cellule non trattate
CV05	La concentrazione minima della sostanza chimica alla quale Inh-GAPLA

è < 0,05.

11. Sono disponibili standard di prestazione (15) che facilitano la validazione di metodi di prova della luciferasi IL-8 *in vitro* modificati simili al metodo di prova IL-8 Luc e permettono di modificare rapidamente la linea guida dell'OCSE 442E per potervi inserire. L'accettazione reciproca dei dati nel quadro dell'OCSE sarà garantita solo per i metodi di prova validati in base agli standard di prestazione, se tali metodi di prova sono stati esaminati e integrati dall'OCSE nella linea guida 442E.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA

12. Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice relativa al metodo di prova B.71, i laboratori devono dimostrare le loro competenze tecniche utilizzando le 10 sostanze di riferimento elencate nell'appendice 3.3, conformemente alle buone pratiche per i metodi *in vitro* (17). Inoltre gli utilizzatori del metodo devono mantenere una banca dati storica contenente i dati ottenuti con i controlli di reattività (cfr. il paragrafo 15) nonché con i controlli positivi e con solvente/disperdente (cfr. i paragrafi 21-24) e utilizzare tali dati per confermare la persistenza nel tempo della riproducibilità della prova nel loro laboratorio.

PROCEDURA

13. La procedura operativa standard per il metodo di prova IL-8 Luc è disponibile e dovrebbe essere applicata quando si utilizza questo metodo di prova (18). I laboratori che intendono applicare questo metodo di prova possono ottenere la linea cellulare ricombinante THP-G8 dal laboratorio GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Giappone, previa sottoscrizione di un accordo di trasferimento di materiale (*Material Transfer Agreement*, MTA) secondo le condizioni riportate nel modello dell'OCSE. Nei paragrafi che seguono è fornita una descrizione dei principali elementi e procedure del metodo di prova.

Preparazione delle cellule

14. Per l'esecuzione del metodo di prova IL-8 Luc è opportuno utilizzare la linea cellulare THP-G8 del laboratorio GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Giappone, (cfr. i paragrafi 8 e 13). Al ricevimento, le cellule sono moltiplicate (2-4 passaggi) al fine di costituire uno stock omogeneo da conservare in stato di congelamento. Le cellule di questo stock possono essere moltiplicate fino a un massimo di 12 passaggi o per un massimo di 6 settimane. Il mezzo di coltura utilizzato per la propagazione cellulare è l'RPMI-1640 contenente 10 % di siero fetale bovino (FBS), una soluzione antibiotica/antimicotica (100 U/ml di penicillina G, 100 µg/ml di streptomina e 0,25 µg/ml di amfotericina B in una soluzione salina allo

0,85 %) (ad es. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml di puromicina (ad es. CAS:58-58-2) e 300 µg/ml di G418 (ad es. CAS:108321-42-2).

15. Prima di essere utilizzate per la prova, le cellule devono essere qualificate mediante un controllo di reattività da realizzarsi dopo 1-2 settimane o 2-4 passaggi dallo scongelamento mediante 4-nitrobenzilbromuro (4-NBB) (CAS:100-11-8, purezza ≥ 99 %) come controllo positivo e acido lattico (LA) (CAS:50-21-5, purezza ≥ 85 %) come controllo negativo. Il 4-NBB deve dar luogo a una risposta positiva per Ind-IL8LA ($\geq 1,4$) e l'acido lattico deve dar luogo a una risposta negativa per Ind-IL8LA ($< 1,4$). Per la prova vengono utilizzate unicamente le cellule che superano il controllo di reattività. Il controllo va effettuato secondo le procedure descritte ai paragrafi 22-24.
16. Per la prova, le cellule THP-G8 sono inoculate a una densità compresa tra 2 e 5×10^5 cellule/ml e precoltivate in fiasche di coltura per una durata compresa tra 48 e 96 ore. Il giorno della prova le cellule raccolte dalla fiasca di coltura sono lavate con RPMI-1640 contenente 10 % di FBS senza antibiotici, poi sono rimesse in sospensione a una densità di 1×10^6 cellule/ml con RPMI-1640 contenente 10 % di FBS senza antibiotici. Quindi le cellule sono ripartite su una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (ad es. Costar Cat#3603) con 50 µl (5×10^4 cellule/pozzetto).

Preparazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

17. La sostanza chimica in esame e le sostanze di controllo vengono preparate il giorno della prova. Per il metodo di prova IL-8 Luc, le sostanze chimiche in esame vengono disciolte in X-VIVO™ 15, un mezzo senza siero disponibile in commercio (Lonza, 04-418Q), fino a una concentrazione finale di 20 mg/ml. Il mezzo X-VIVO™ 15 è addizionato a 20 mg di sostanza chimica in esame (a prescindere dalla solubilità della sostanza chimica) in una provetta da microcentrifuga fino a raggiungere un volume di 1 ml e successivamente agitato vigorosamente su vortex e posto su un rotore a una velocità massima di 8 rpm per 30 minuti a una temperatura ambiente di circa 20°C. Inoltre, se le sostanze chimiche solide continuano a essere insolubili, la provetta è sonicata fino a dissoluzione completa della sostanza o fino all'ottenimento di una dispersione stabile. Se le sostanze chimiche in esame sono solubili in X-VIVO™ 15, la soluzione è diluita di un fattore 5 con X-VIVO™ 15 e utilizzata come soluzione madre della sostanza chimica in X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Se le sostanze chimiche in esame non sono solubili in X-VIVO™ 15, la miscela è nuovamente agitata su rotore per almeno 30 minuti e successivamente centrifugata a 15 000 rpm (≈ 20 000 g) per 5 minuti; il supernatante così ottenuto è utilizzato come soluzione madre della sostanza chimica in esame in X-VIVO™ 15. Qualora si utilizzino altri solventi, quali DMSO, acqua o mezzo di coltura, è necessario fornire un'adeguata motivazione scientifica. L'appendice 3.5 illustra la procedura dettagliata per la diluizione delle sostanze chimiche. Le soluzioni in X-VIVO™ 15 descritte ai paragrafi 18-23 sono mescolate nella

proporzione 1:1 (v/v) con le sospensioni cellulari preparate nella piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (cfr. il paragrafo 16).

18. La prima batteria di prove è intesa a determinare la concentrazione citotossica e a valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche. Avvalendosi di X-VIVO™ 15, si effettuano diluizioni in serie di fattore 2 delle soluzioni madre delle sostanze chimiche in esame in X-VIVO™ 15 (cfr. l'appendice 3.5) mediante un blocco a 96 pozzetti (ad es. Costar Cat#EW-01729-03). Quindi 50 µl/pozzetto di soluzione diluita sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare in una piastra nera a fondo piatto da 96 pozzetti. Pertanto, per le sostanze chimiche in esame solubili in X-VIVO™ 15, le concentrazioni finali della sostanza chimica vanno da 0,002 a 2 mg/ml (appendice 3.5). Per le sostanze chimiche in esame non solubili in X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml vengono determinati unicamente fattori di diluizione compresi tra 2 e 2¹⁰, nonostante le concentrazioni finali effettive delle sostanze chimiche rimangano incerte e dipendano dalla concentrazione di saturazione delle sostanze stesse nella soluzione madre di X-VIVO™ 15.
19. Nelle batterie di prove successive (seconda, terza e quarta replica), la soluzione madre di X-VIVO™ 15 è preparata a una concentrazione 4 volte superiore alla concentrazione di vitalità cellulare 05 (CV05; la concentrazione minima alla quale Inh-GAPLA è < 0,05) osservata nel primo esperimento. Se il valore Inh-GAPLA non scende al di sotto di 0,05 alla concentrazione massima utilizzata nella prima prova, la soluzione madre X-VIVO™ 15 è preparata alla concentrazione massima della prima batteria di prove. La concentrazione CV05 è calcolata dividendo la concentrazione della soluzione madre della prima batteria di prove per il fattore di diluizione di CV05 (X) necessario per diluire la soluzione madre fino a raggiungere il valore CV05 (cfr. l'appendice 3.5). Per le sostanze chimiche in esame non solubili in X-VIVO a 20 mg/ml, il valore CV05 è determinato dalla concentrazione della soluzione madre x 1/X. Per le batterie di prove da 2 a 4 viene preparata una seconda soluzione madre a una concentrazione di 4 x CV05 (appendice 3.5).
20. Diluizioni in serie di fattore 1,5 delle seconde soluzioni madre di X-VIVO™ 15 vengono effettuate utilizzando un blocco a 96 pozzetti. Quindi 50 µl/pozzetto di soluzione diluita sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare nei pozzetti di una piastra nera a fondo piatto da 96 pozzetti. Ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame deve essere testata in 4 pozzetti. I campioni sono successivamente miscelati su un agitatore di piastre e messi in incubazione per 16 ore a 37 °C e 5 % CO₂, quindi si misura l'attività della luciferasi come descritto nel prosieguo.
21. Il controllo con solvente è la miscela di 50 µl/pozzetto di X-VIVO™ 15 e 50 µl/pozzetto di sospensione cellulare in RPMI-1640 contenente 10 % di FBS.

22. Il controllo positivo raccomandato è il 4-NBB. A 20 mg di 4-NBB preparati in una provetta da microcentrifuga da 1,5-ml si aggiunge X-VIVO™ 15 fino a raggiungere 1 ml. La provetta è agitata vigorosamente su vortex e posta su un rotore a una velocità massima di 8 rpm per almeno 30 minuti. Dopo centrifugazione a 20 000 g per 5 minuti, il supernatante è diluito di un fattore 4 con X-VIVO™ 15 e 500 µl del supernatante diluito sono trasferiti in un blocco a 96 pozzetti. Il supernatante diluito è ulteriormente diluito con X-VIVO™ 15 di un fattore 2 e 4 e 50 µl della soluzione sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare THP-G8 nei pozzetti di una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (appendice 3.6). Ciascuna concentrazione del controllo positivo deve essere testata in 4 pozzetti. La piastra è agitata su un agitatore e messa in incubazione in un incubatore a CO₂ per 16 ore (37 °C, 5 % CO₂), quindi si misura l'attività della luciferasi come descritto al paragrafo 29.
23. Il controllo negativo raccomandato è l'acido lattico. A 20 mg di acido lattico preparati in una provetta da microcentrifuga da 1,5-ml si aggiunge X-VIVO™ 15 fino a raggiungere 1 ml (20 mg/ml). Si diluiscono 20 mg/ml di soluzione di acido lattico di un fattore 5 con X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl di questa soluzione di acido lattico a 4 mg/ml vengono poi trasferiti in un pozzetto di un blocco a 96 pozzetti. Questa soluzione viene diluita di un fattore 2 con X-VIVO™ 15, quindi nuovamente diluita di un fattore 2 per ottenere soluzioni a 2 mg/ml e 1 mg/ml. 50 µl di queste 3 soluzioni e del controllo con disperdente (X-VIVO™ 15) sono addizionati a 50 µl di sospensione cellulare THP-G8 nei pozzetti di una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti. Ciascuna concentrazione del controllo negativo è testata in 4 pozzetti. La piastra è agitata su un agitatore e messa in incubazione in un incubatore a CO₂ per 16 ore (37 °C, 5 % CO₂), quindi si misura l'attività della luciferasi come descritto al paragrafo 29.
24. Altri controlli positivi o negativi adeguati possono essere utilizzati in caso di disponibilità di dati storici da cui ricavare criteri di accettabilità comparabili per la prova.
25. Si avrà cura di evitare l'evaporazione delle sostanze chimiche volatili in esame nonché la contaminazione incrociata tra i pozzetti da parte delle sostanze stesse, ad esempio sigillando la piastra prima dell'incubazione con le sostanze chimiche in esame.
26. Per le sostanze chimiche in esame e il controllo con solvente occorrono da 2 a 4 batterie di prove per ottenere una predizione negativa o positiva (cfr. la tabella 2). Ogni batteria di prove è eseguita in un giorno diverso con una nuova soluzione madre delle sostanze chimiche in esame in X-VIVO™ 15 e cellule raccolte in modo indipendente. Le cellule possono provenire dallo stesso passaggio.

Misurazioni dell'attività della luciferasi

27. La luminescenza è misurata con un luminometro per micropiastre a 96 pozzetti dotato di filtri ottici, ad es. delle serie Phelios (ATTO, Tokyo, Giappone), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germania) o ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Il luminometro deve essere calibrato per ogni prova al fine di garantire la riproducibilità (19). Per la calibrazione esistono luciferasi ricombinanti a emissione arancione e rossa.
28. In ciascun pozzetto della piastra contenente la sospensione cellulare trattata con o senza sostanza chimica si trasferiscono 100 µl di reagente preriscaldato Tripluc® Luciferase (Tripluc). La piastra è agitata per 10 minuti a una temperatura ambiente di circa 20 °C e successivamente collocata nel luminometro per misurare l'attività della luciferasi. La bioluminescenza è misurata per 3 secondi senza filtro ottico (F0) e per altri 3 secondi con filtro ottico (F1). L'eventuale ricorso a impostazioni alternative, ad esempio per adeguarsi al modello di luminometro utilizzato, deve essere opportunamente giustificato.
29. Per ogni concentrazione i parametri sono calcolati a partire dai valori misurati, ad esempio IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, la media ± deviazione standard (SD) di IL8LA, la media ± SD di GAPLA, la media ± SD di nIL8LA, la media ± SD di Ind-IL8LA, la media ± SD di Inh-GAPLA e l'intervallo di confidenza del 95 % per Ind-IL8LA. Le definizioni dei parametri utilizzati nel presente paragrafo sono riportate rispettivamente nelle appendici I e IV.
30. Prima di procedere alla misurazione, nelle prove con reporter policromatici si effettua generalmente una discriminazione cromatica mediante rivelatori (luminometro e lettore di piastre) dotati di filtri ottici, quali filtri taglia banda (passa-alto o passa-basso) o filtri passa-banda. I coefficienti di trasmissione dei filtri per ciascun colore del segnale di bioluminescenza devono essere calibrati prima della prova, come descritto nell'appendice 3.2.

DATI E RELAZIONI

Valutazione dei dati

31. I criteri da rispettare in ogni batteria di prove per formulare una decisione positiva o negativa sono i seguenti:
- una predizione formulata con il metodo di prova IL-8 Luc è considerata positiva se una sostanza chimica in esame presenta un valore Ind-IL8LA $\geq 1,4$ e il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95 % di Ind-IL8LA $\geq 1,0$
 - una predizione formulata con il metodo di prova IL-8 Luc è considerata negativa se una sostanza chimica in esame presenta un valore Ind-IL8LA $< 1,4$ e il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95 % di Ind-IL8LA $< 1,0$

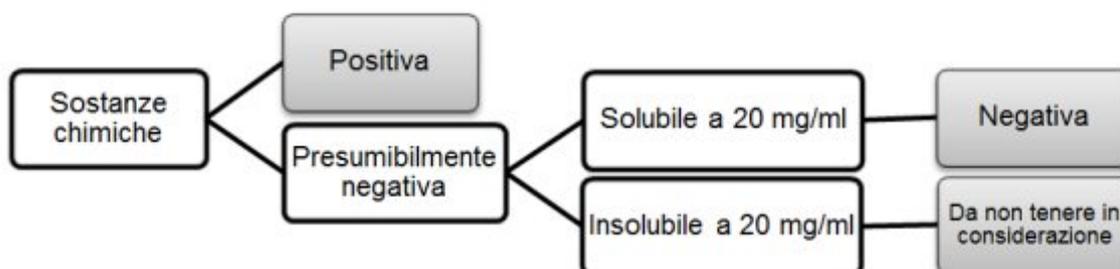
Modello predittivo

32. Le sostanze chimiche in esame che producono due risultati positivi nella 1^a, 2^a, 3^a o 4^a batteria di prove sono considerate positive, quelle che producono tre risultati negativi nella 1^a, 2^a, 3^a o 4^a batteria di prove sono considerate presumibilmente negative (tabella 2). Tra le sostanze chimiche presumibilmente negative, le sostanze disciolte a 20 mg/ml di X-VOVO™ 15 sono considerate negative, mentre le sostanze non disciolte a 20 mg/ml di X-VOVO™ 15 non sono prese in considerazione (figura 1).

Tabella 2: Criteri di identificazione delle sostanze positive e presumibilmente negative

1 ^a batteria di prove	2 ^a batteria di prove	3 ^a batteria di prove	4 ^a batteria di prove	Predizione finale	
Positiva	Positiva	-	-	Positiva	
	Negativa	Positiva	-	Positiva	
		Negativa	Positiva	Negativa	Presumibilmente negativa
	Negativa		Negativa	Negativa	Presumibilmente negativa
Negativa	Positiva	Positiva	-	Positiva	
		Negativa	Positiva	Positiva	
	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Presumibilmente negativa
			Negativa	Negativa	Presumibilmente negativa
	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva
			Negativa	Negativa	Presumibilmente negativa
		Negativa	-	Presumibilmente negativa	

Figura 1: Modello predittivo per la decisione finale



Criteri di accettabilità

33. Quando si utilizza il metodo di prova IL-8 Luc devono essere soddisfatti i criteri di accettabilità elencati di seguito:

- il valore Ind-IL8LA deve essere superiore a 5,0 ad almeno una concentrazione del controllo positivo, 4-NBB, in ciascuna batteria di prove;
- il valore Ind-IL8LA deve essere inferiore a 1,4 ad ogni concentrazione del controllo negativo, l'acido lattico, in ciascuna batteria di prove;
- i dati ottenuti da piastre in cui il valore GAPLA dei pozzetti di controllo contenenti cellule e Tripluc, ma non sostanze chimiche, è inferiore a 5 volte il valore del pozzetto che contiene unicamente il mezzo di prova (50 µl/pozzetto di RPMI-1640 contenente 10 % di FBS e 50 µl/pozzetto di X-VIVO™ 15) devono essere scartati;
- i dati ottenuti da piastre in cui il valore Inh-GAPLA di tutte le concentrazioni delle sostanze chimiche in esame o delle sostanze di controllo è inferiore a 0,05 devono essere scartati. In questo caso occorre ripetere la prima prova in modo che la concentrazione finale massima della prova ripetuta corrisponda alla concentrazione finale minima della prova precedente.

Relazione sulla prova

34. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanze chimiche in esame

Sostanza monocostrituente:

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- aspetto fisico, idrosolubilità, peso molecolare, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- solubilità in X-VIVO™ 15. Per le sostanze chimiche insolubili in X-VIVO™ 15, se si osserva precipitazione o flottazione dopo la centrifugazione;
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;

- se non è stato utilizzato X-VIVO™ 15, motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Sostanza multicomponente, UVCB o miscela:

- caratterizzazione, nella misura del possibile, ad esempio attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), purezza, proporzioni quantitative e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sopra) dei costituenti, secondo i dati disponibili;
- aspetto fisico, idrosolubilità, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, se disponibili;
- peso molecolare o peso molecolare apparente nel caso di miscele/polimeri di composizione nota o altre informazioni pertinenti per la realizzazione dello studio;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- solubilità in X-VIVO™ 15. Per le sostanze chimiche insolubili in X-VIVO™ 15, se si osserva precipitazione o flottazione dopo la centrifugazione;
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- se non è stato utilizzato X-VIVO™ 15, motivazione della scelta del solvente/disperdente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Controlli

Controllo positivo:

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS, il codice SMILES o InChI, la formula di struttura e/o altri identificatori;
- aspetto fisico, idrosolubilità, peso molecolare e proprietà fisico-chimiche pertinenti aggiuntive, se del caso e a seconda dei dati disponibili;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- trattamento prima della prova, se del caso (ad esempio riscaldamento, frantumazione);
- concentrazione/i testata/e;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- riferimento ai dati storici relativi ai controlli positivi che dimostrano la conformità ai criteri di accettabilità, se del caso.

Controllo negativo:

- identificazione della sostanza chimica: denominazioni quali i nomi IUPAC o CAS, i numeri CAS e/o altri identificatori;
- purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se fattibile dal punto di vista pratico, ecc.;
- aspetto fisico, peso molecolare e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti, nel caso siano utilizzati controlli negativi diversi da quelli menzionati nelle linee guida e se disponibili;
- condizioni di conservazione e stabilità, a seconda dei dati disponibili;
- motivazione della scelta del solvente per ciascuna sostanza chimica in esame.

Condizioni della prova

- nome e indirizzo dello sponsor, dell'infrastruttura utilizzata per la prova e del responsabile dello studio;
- descrizione del sistema di prova utilizzato;
- linea cellulare utilizzata, condizioni di conservazione e provenienza (ad esempio, l'infrastruttura dalla quale provengono le cellule);
- numero di lotto e origine dell'FBC, nome del fornitore, numero di lotto della piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti e numero di lotto del reagente Tripluc;
- numero di passaggi e densità cellulare utilizzata per la prova;
- metodo di conteggio delle cellule utilizzato per l'inoculazione prima della prova e misure prese per assicurare una distribuzione omogenea del numero di cellule;
- luminometro utilizzato (ad esempio il modello), compresi le impostazioni dello strumento, il substrato di luciferasi utilizzato e la dimostrazione della qualità delle misurazioni della luminescenza sulla base della prova descritta nell'appendice 3.2;
- procedura utilizzata per dimostrare la competenza del laboratorio nell'esecuzione della prova (ad esempio sottoponendo la prova a sostanze di riferimento) o per dimostrare la riproducibilità della prova nel tempo.

Procedura

- numero di repliche e di batterie di prove eseguite;
- concentrazioni della sostanza chimica in esame, modalità di applicazione e tempo di esposizione (se diversi da quelli raccomandati);
- descrizione dei criteri di valutazione e di decisione impiegati;
- descrizione dei criteri di accettabilità dello studio;

- descrizione di qualsiasi modifica della procedura sperimentale.

Risultati

- misurazioni di IL8LA e GAPLA;
- calcoli per nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;
- intervallo di confidenza del 95 % di Ind-IL8LA;
- grafico raffigurante le curve dose-risposta per l'induzione dell'attività della luciferasi e la vitalità;
- descrizione di eventuali altre osservazioni pertinenti, se del caso.

Discussione dei risultati

- discussione dei risultati ottenuti con il metodo di prova IL-8 Luc;
- esame dei risultati della prova nel quadro di un approccio di tipo IATA, qualora siano disponibili altre informazioni pertinenti.

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, *et al.* (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OECD (2017). In attesa di pubblicazione - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OCSE, Parigi, Francia
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OCSE, Parigi, Francia.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic

Cooperation and Development, Paris. Consultabile al seguente indirizzo:
[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, consultabile al seguente indirizzo: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OCSE, Parigi, Francia.
- (21) Nazioni Unite (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Consultabile al seguente indirizzo:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Appendice 3.1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con la prova e i valori di riferimento comunemente accettati. Misura l'efficienza della prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza", per indicare la proporzione di risultati corretti di una prova (16).

AOP (*Adverse Outcome Pathway, meccanismo d'azione degli effetti avversi*): sequenza di eventi che, a partire dalla struttura chimica di una sostanza chimica bersaglio o di un gruppo di sostanze chimiche simili, attraverso l'evento molecolare scatenante, produce un effetto avverso *in vivo* (20).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

CV05: vitalità cellulare 05, cioè la concentrazione minima alla quale le sostanze chimiche producono un valore Inh-GAPLA inferiore a 0,05.

FInSLO-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a Ind IL8LA. Cfr. la definizione di Ind-IL8LA.

GAPLA: attività di luciferasi che emette *Stable Luciferase Red* (SLR) ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), regolata dal promotore GAPDH, che dimostra la vitalità cellulare e il numero di cellule vitali.

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

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment, approcci integrati in materia di prove e valutazioni*): approccio strutturato utilizzato per l'identificazione del pericolo (potenziale), la caratterizzazione del pericolo (potenza) e/o la valutazione della sicurezza (potenziale/potenza ed esposizione) di una sostanza chimica o di un gruppo di sostanze chimiche, che integra in modo strategico e ponderato tutti i dati pertinenti per orientare una decisione di tipo regolamentare concernente il pericolo potenziale e/o il rischio e/o la necessità di effettuare altre prove mirate e, pertanto, limitate allo stretto necessario.

II-SLR-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a Inh-GAPLA. Cfr. la definizione di Inh-GAPLA.

IL-8 (*Interleuchina-8*): citochina derivata da cellule endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, macrofagi e monociti che provoca la chemotassi di neutrofili e dei linfociti T.

IL8LA: attività della luciferasi che emette *Stable Luciferase Orange* (SLO) ($\lambda_{\max} = 580$

nm), regolata dal promotore IL-8.

Ind-IL8LA: variazione di induzione di IL8LA. Si calcola dividendo il valore nIL8LA delle cellule THP-G8 trattate con le sostanze chimiche per il valore nIL8LA delle cellule THP-G8 non stimolate e rappresenta l'induzione del promotore IL-8 da parte delle sostanze chimiche.

Inh-GAPLA: inibizione di GAPLA. Si calcola dividendo il valore GAPLA delle cellule THP-G8 trattate con sostanze chimiche per il valore GAPLA delle cellule THP-G8 non trattate e rappresenta la citotossicità delle sostanze chimiche.

Soglia minima di induzione (MIT): la concentrazione minima alla quale la sostanza chimica soddisfa il criterio di positività.

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

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

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

nIL8LA: l'attività della luciferasi SLO che rispecchia l'attività del promotore IL 8 (IL8LA) normalizzata dall'attività della luciferasi SLR che rispecchia l'attività del promotore GAPDH (GALPA). Rappresenta l'attività del promotore IL-8 tenendo in considerazione la vitalità cellulare o il numero delle cellule.

nSLO-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a nIL8LA. Cfr. la definizione di nIL8LA.

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

Preapteni: sostanze chimiche che diventano sensibilizzanti tramite trasformazione abiotica.

Proapteni: sostanze chimiche che necessitano di un'attivazione enzimatica per dispiegare il loro potenziale di sensibilizzazione cutanea.

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

dell'accuratezza (concordanza) di una prova (16).

Affidabilità: misura in cui una prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità interna ai laboratori e la ripetibilità fra i laboratori (16).

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

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (16).

SLO-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a IL8LA. Cfr. la definizione di IL8LA.

SLR-LA: abbreviazione utilizzata nella relazione di validazione e in studi precedenti concernenti il metodo di prova IL-8 Luc per fare riferimento a GAPLA. Cfr. la definizione di GAPLA.

Controllo con solvente/disperdente: campione non trattato contenente tutti i componenti di un sistema di prova, esclusa la sostanza chimica in esame, ma incluso il solvente/disperdente utilizzato. È utilizzato per stabilire la risposta di base per i campioni trattati con la sostanza chimica in esame disciolta o in dispersione stabile nello stesso solvente/disperdente. Se testato in concomitanza con un controllo con mezzo, questo campione dimostra anche se il solvente/disperdente interagisce con il sistema di prova.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di una prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di una prova (16).

Sostanza: elemento chimico e suoi composti allo stato naturale o ottenuti mediante un processo di produzione, compresi gli additivi necessari a conservare la stabilità del prodotto e le impurezze derivanti dal processo utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza ripercussioni sulla stabilità della sostanza o modifiche della sua composizione.

Tensioattivo: denominato anche surfattante, è una sostanza, come un detergente, in grado di ridurre la tensione superficiale di un liquido consentendo quindi di formare schiuma o di penetrare solidi; è noto anche come agente umettante. (TG n. 437)

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

THP-G8: linea cellulare reporter IL-8 utilizzata nel metodo di prova IL-8 Luc. La linea

cellulare umana macrofagica THP-1 è stata trasfettata con i geni della luciferasi SLO e SLR sotto il controllo dei promotori IL-8 e GAPDH, rispettivamente.

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (21).

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

Metodo di prova valido: metodo di prova la cui pertinenza e affidabilità sono ritenute soddisfacenti per uno scopo specifico e che si fonda su principi scientificamente provati. Un metodo di prova non è mai valido in assoluto ma solo in relazione a un determinato scopo.

Appendice 3.2

PRINCIPIO DI MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA LUCIFERASI E DETERMINAZIONE DEI COEFFICIENTI DI TRASMISSIONE DEI FILTRI OTTICI PER SLO E SLR

Il sistema di prova MultiReporter - Tripluc - può essere utilizzato con un luminometro per micropiastre dotato di un sistema di rilevazione policromatico con filtro ottico [ad es. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Il filtro ottico utilizzato per la misurazione è un filtro passa-alto o passa-basso di 600–620 nm o un filtro passa-banda di 600–700 nm.

Misurazione di luciferasi bicromatiche con un filtro ottico

L'esempio che segue è realizzato con un apparecchio AB-2350 (ATTO). Questo luminometro è dotato di un filtro passa-alto di 600 nm (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, filtro 1) che consente di separare la luminescenza SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) dalla luminescenza SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Per determinare i coefficienti di trasmissione del filtro 600 nm LP si utilizzano in primo luogo enzimi luciferasi SLO e SLR purificati per i) misurare l'intensità di bioluminescenza di SLO e SLR senza filtro (F0), ii) misurare l'intensità di bioluminescenza di SLO e SLR che attraversa il filtro 600 nm LP (filtro 1), e iii) calcolare i coefficienti di trasmissione del filtro 600 nm LP per SLO e SLR indicati di seguito.

Coefficienti di trasmissione		Abbreviazione	Definizione
SLO	Filtro 1 Coefficienti di trasmissione	κ_{OR60}	Coefficiente di trasmissione del filtro per SLO
SLR	Filtro 1 Coefficienti di trasmissione	κ_{R60}	Coefficiente di trasmissione del filtro per SLR

Se l'intensità di SLO e SLR nel campione di prova è definita rispettivamente come O e R, i) l'intensità della luce senza filtro (sistema interamente ottico) F0 e ii) l'intensità della luce trasmessa attraverso il filtro 600 nm LP (filtro 1) F1 sono descritte come segue.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa_{OR60} \times O + \kappa_{RR60} \times R$$

Tali formule possono essere esplicitate come segue:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{OR60} & \kappa_{RR60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Quindi, a partire dai fattori di trasmittanza calcolati (κ_{OR60} e κ_{RR60}) e dai valori F0 e F1 misurati, è possibile calcolare i valori O e R come segue:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{OR60} & \kappa_{RR60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiali e metodi per la determinazione del fattore di trasmittanza

(1) Reagenti

Enzimi luciferasi purificati:

enzima SLO purificato liofilizzato

enzima SLR purificato liofilizzato

(nello studio di validazione gli enzimi sono stati ottenuti dal laboratorio GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Giappone, con una linea cellulare THP-G8)

Reagente della prova:

Tripluc® Luciferase (ad esempio da TOYOBO Cat#MRA-301)

Mezzo: per la prova della luciferasi (30 ml, conservato a 2 - 8 °C)

Reagente	Concentrazione	Concentrazione finale nel mezzo	Volume necessario
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Preparazione della soluzione enzimatica:

Sciogliere l'enzima luciferasi purificato liofilizzato in una provetta aggiungendo 200 μ l di 10 ~ 100 mM Tris/HCl o Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) con aggiunta di 10 % (p/v) di glicerolo, suddividere la soluzione enzimatica in aliquote da 10 μ l in provette monouso da 1,5 ml e riporre in congelatore a -80 °C. La soluzione enzimatica congelata può essere utilizzata per un massimo di 6 mesi. Per utilizzare la soluzione, aggiungere 1 ml di mezzo della prova di luciferasi (RPMI-1640 con 10 % di FBS) a ciascuna provetta contenente la soluzione enzimatica (soluzione enzimatica diluita) e conservare le provette su ghiaccio per evitare la disattivazione.

(3) Misurazione della bioluminescenza

Scongelare il reagente della prova di luciferasi Tripluc[®] (Tripluc) e conservarlo a temperatura ambiente a bagnomaria o all'aria. Accendere il luminometro 30 minuti prima di iniziare la misurazione per consentire la stabilizzazione del fotomoltiplicatore. Trasferire 100 µl di soluzione enzimatica diluita in una piastra nera a fondo piatto a 96 pozzetti (campione di riferimento SLO in #B1, #B2, #B3, campione di riferimento SLR in #D1, #D2, #D3). Quindi, per mezzo di una pipetta automatica, trasferire 100 µl di Tripluc preriscaldato in ciascun pozzetto della piastra contenente la soluzione enzimatica diluita. Agitare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente (25 °C circa) su un agitatore per piastre. Asportare eventuali bolle dalle soluzioni contenute nei pozzetti. Collocare la piastra nel luminometro per misurare l'attività della luciferasi. La bioluminescenza è misurata per 3 secondi senza filtro ottico (F0) e per altri 3 secondi con filtro ottico (F1).

Il coefficiente di trasmissione del filtro ottico è stato calcolato come segue:

coefficiente di trasmissione (SLO (κ_{OR60}))= (#B1 di F1+ #B2 di F1+ #B3 di F1) / (#B1 di F0+ #B2 di F0+ #B3 of F0)

coefficiente di trasmissione (SLR (κ_{R60}))= (#D1 di F1+ #D2 di F1+ #D3 di F1) / (#D1 di F0+ #D2 di F0+ #D3 of F0)

I fattori di trasmittanza calcolati sono utilizzati per tutte le misurazioni realizzate con lo stesso luminometro.

Controllo di qualità dell'attrezzatura

Devono essere utilizzate le procedure descritte nel protocollo IL-8 Luc (18).

Appendice 3.3

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA

Prima di utilizzare come test di routine la prova descritta nella presente appendice per il metodo di prova B.71, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica ottenendo la predizione attesa con il metodo di prova IL-8 Luc per le 10 sostanze raccomandate nella tabella 1 e ottenendo valori che rientrino nel rispettivo intervallo di riferimento per almeno 8 delle 10 sostanze di riferimento (selezionate in modo da rappresentare la gamma delle risposte corrispondenti ai pericoli di sensibilizzazione cutanea). Altri criteri di selezione riguardavano la disponibilità in commercio delle sostanze e la disponibilità di dati di riferimento *in vivo* e di dati *in vitro* di elevata qualità ottenuti con il metodo di prova IL-8 Luc. Sono inoltre disponibili dati di riferimento pubblicati per il metodo di prova IL-8 Luc (6) (1).

Tabella 1: Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica con il metodo di prova IL-8 Luc

Sostanze di prova per la verifica della competenza	N. CAS	Stato	Solubilità in X-VIVO15 a 20 mg/ml	Predizione ¹ <i>in vivo</i>	Predizione IL-8 Luc ²	Intervallo di riferimento (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-Dinitroclorobenzene	97-00-7	Solido	Insolubile	Sensibilizzante (estremamente elevato)	Positivo	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeide	50-00-0	Liquido	Solubile	Sensibilizzante (elevato)	Positivo	9-30	4-9
2-Mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Solido	Insolubile	Sensibilizzante (moderato)	Positivo	250-290	60-250
Etilendiammina	107-15-3	Liquido	Solubile	Sensibilizzante (moderato)	Positivo	500-700	0,1-0,4
Etilene glicol dimetacrilato	97-90-5	Liquido	Insolubile	Sensibilizzante (debole)	Positivo	>2000	0,04-0,1
4-Allilanisolo (estragolo)	140-67-0	Liquido	Insolubile	Sensibilizzante (debole)	Positivo	>2000	0,01-0,07
Solfato di streptomina	3810-74-0	Solido	Solubile	Non sensibilizzante	Negativo	>2000	>2000
Glicerolo	56-81-5	Liquido	Solubile	Non sensibilizzante	Negativo	>2000	>2000
Isopropanolo	67-63-0	Liquido	Solubile	Non sensibilizzante	Negativo	>2000	>2000

Abbreviazioni: N. CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*) = Numero CAS (numero di registrazione nell'inventario europeo delle sostanze chimiche).

¹ La potenza *in vivo* è determinata mediante criteri proposti da ECETOC (19).

² Sulla base dei dati storici osservati (1) (6).

³ I valori CV05 e IL-8 Luc MIT sono stati calcolati sulla base dell'idrosolubilità indicata dal programma EPI Suite™.

⁴ CV05: la concentrazione minima alla quale le sostanze chimiche producono un valore Inh-GAPLA inferiore a 0,05.

⁵ MIT: le concentrazioni minime alle quali la sostanza chimica soddisfa il criterio di positività.

Appendice 3.4

INDICI E CRITERI DI VALUTAZIONE

nIL8LA (nSLO-LA)

La j-esima ripetizione ($j = 1 - 4$) della i-esima concentrazione ($i = 0 - 11$) è misurata per IL8LA (SLO-LA) e GAPLA (SLR-LA) rispettivamente. Il valore IL8LA normalizzato, detto nIL8LA (nSLO-LA), è definito come segue:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Si tratta dell'unità di misura di base per questo metodo di prova.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

L'aumento del valore medio nIL8LA (nSLO-LA) per la ripetizione alla i-esima concentrazione rispetto alla concentrazione 0, Ind-IL8LA, è la misura principale di questo metodo di prova. Tale rapporto è espresso dalla formula seguente:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Il laboratorio principale ha proposto che un valore di 1,4 corrisponda a un risultato positivo per la sostanza chimica in esame. Tale valore è basato sullo studio dei dati storici del laboratorio principale. L'équipe che si occupa della gestione dei dati ha utilizzato tale valore in tutte le fasi dello studio di validazione. Come risulta dall'equazione, il risultato principale, Ind-IL8LA, è il rapporto di 2 medie aritmetiche.

Intervallo di confidenza del 95 % (CI 95 %)

La precisione della misura di tale risultato principale è stimata mediante l'intervallo di confidenza del 95 % (CI 95 %) basato sul rapporto. Il limite inferiore di CI 95 % ≥ 1 indica che il valore nIL8LA alla i-esima concentrazione è significativamente più elevato del valore ottenuto con il controllo con solvente. L'intervallo di confidenza CI 95 % può essere ricavato in diversi modi. Nel presente studio è stato utilizzato il metodo noto come teorema di Fieller, secondo cui l'intervallo di confidenza del 95 % è calcolato mediante la formula seguente:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

in cui

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}; \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}; \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0,975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}; \quad n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{iL8LA_{0j}}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{iL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_{iL8LA_{ij}}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (n_{iL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ è il 97,5° percentile della distribuzione t centrale con il valore v del grado di libertà,

in cui

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Il valore Inh-GAPLA è il rapporto del valore GAPLA medio (SLR-LA) per la ripetizione della i-esima concentrazione rispetto al valore ottenuto con il controllo con solvente, ed è espresso alla seguente formula:

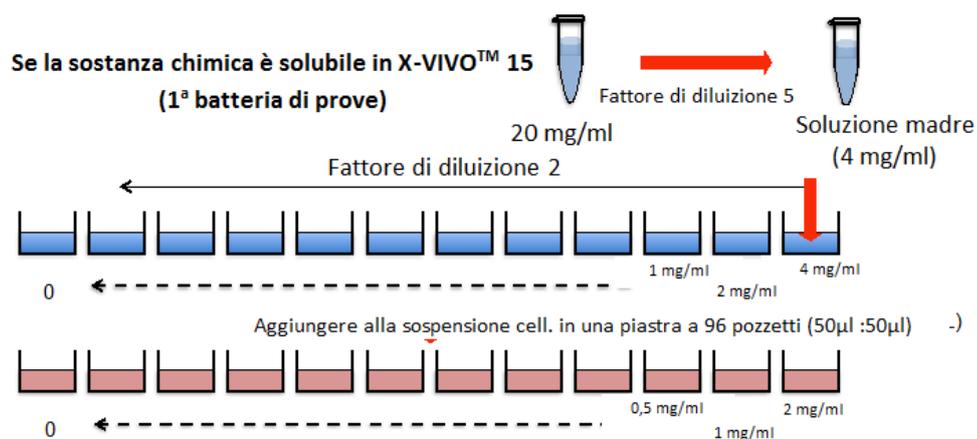
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Essendo GAPLA il denominatore di n_{iL8LA}, un valore estremamente basso determina una grande variazione di n_{iL8LA}. Pertanto i valori Ind-IL8LA con un valore Inh-GAPLA estremamente basso (inferiore a 0,05) vanno considerati di scarsa precisione.

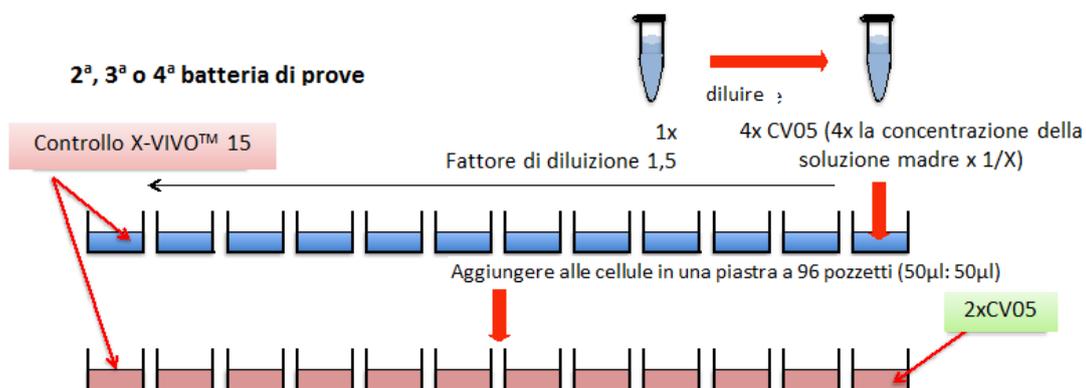
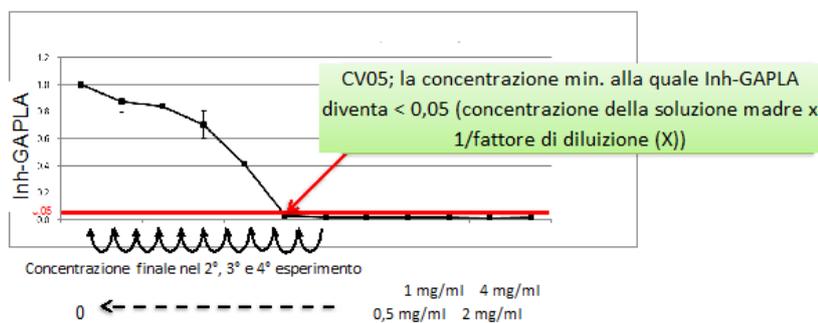
Appendice 3.5

SCHEMA DEI METODI DI DISSOLUZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE PER IL METODO DI PROVA IL-8 LUC

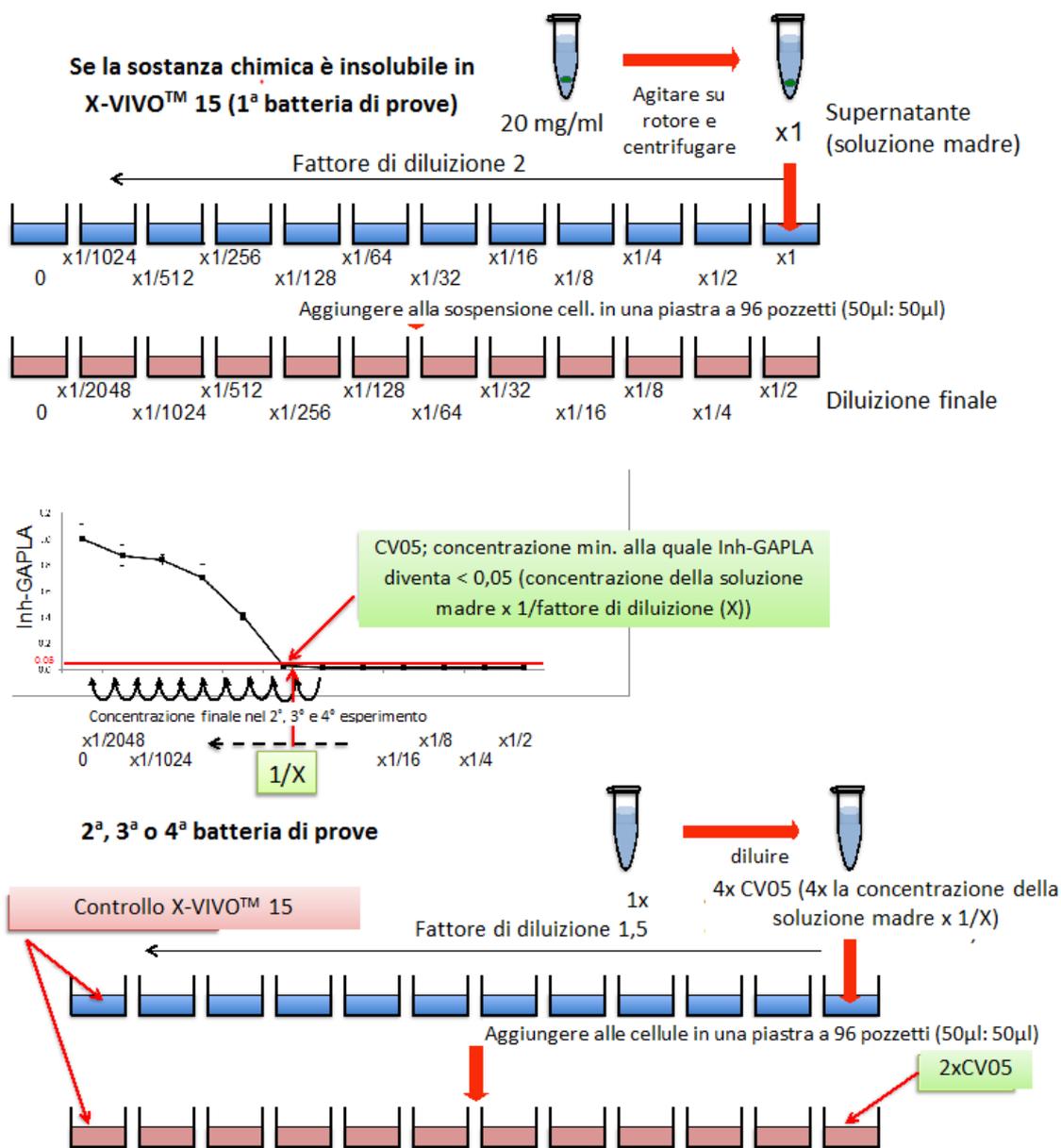
(a) Per le sostanze chimiche disciolte in X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml

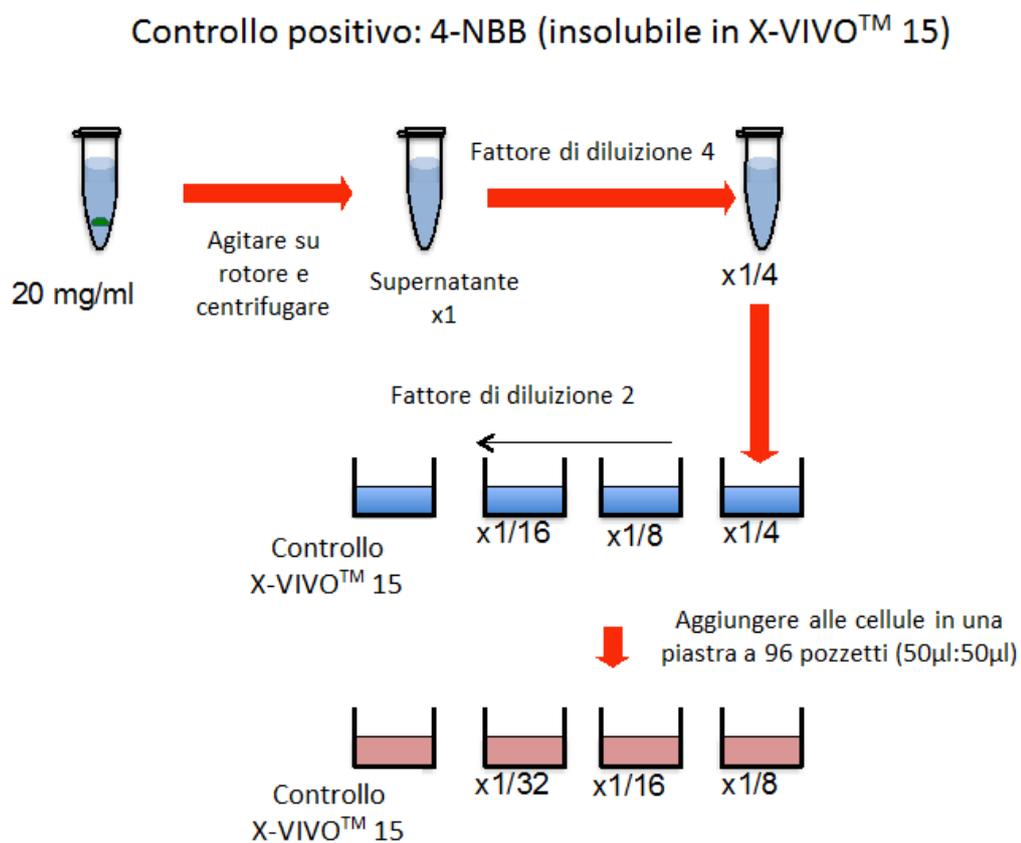


Determinare la concentrazione max. dei seguenti esperimenti



(b) Per le sostanze chimiche insolubili in X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



Appendice 3.6**SCHEMA DEL METODO DI DISSOLUZIONE DEL 4-NBB PER IL CONTROLLO POSITIVO PER IL METODO DI PROVA IL-8 LUC**

"

9) Nella parte C sono aggiunti i seguenti capitoli:

"C.52 PROVA ESTESA DI RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE DI MEDAKA (MEOGRT)

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 240 (2015). La prova estesa di riproduzione su una generazione di Medaka (MEOGRT) descrive un metodo di prova completo basato su pesci esposti per più generazioni al fine di fornire dati pertinenti per la valutazione dei pericoli e dei rischi per l'ambiente legati alle sostanze chimiche, comprese le sostanze chimiche sospettate di essere interferenti endocrini (EDC). Nella prova MEOGRT l'esposizione continua fino alla schiusa [fino a due settimane dopo la fecondazione (sdf)] nella seconda generazione (F2). Ulteriori indagini sarebbero necessarie per giustificare l'utilità di un'eventuale estensione della generazione F2 oltre la schiusa; allo stadio attuale le informazioni sono insufficienti per fornire condizioni o criteri pertinenti per giustificare l'estensione della generazione F2. Questo metodo di prova potrà tuttavia essere aggiornato in funzione di nuovi dati e informazioni. Ad esempio, orientamenti sull'estensione della generazione F2 fino alla riproduzione possono essere utili in determinate circostanze (ad es. sostanze chimiche con elevato potenziale di bioconcentrazione o indicazioni di effetti transgenerazionali in altri taxa). Questo metodo di prova può essere utilizzato per valutare i potenziali effetti cronici delle sostanze chimiche, compresi i potenziali interferenti endocrini, sui pesci. Il metodo concerne principalmente i potenziali effetti a livello di popolazione (ossia le conseguenze negative su sopravvivenza, sviluppo, crescita e riproduzione) per il calcolo della concentrazione senza effetti osservabili (NOEC - *No Observed Effect Concentration*) o della concentrazione efficace (EC_x - *Effect Concentration*), anche se va notato che gli approcci EC_x sono raramente adatti a studi estesi di questo tipo, in cui l'aumento del numero di concentrazioni di prova per determinare la concentrazione efficace desiderata può non risultare pratico e può inoltre causare notevoli preoccupazioni sotto il profilo del benessere animale, visto il gran numero di animali utilizzati. Altri metodi di prova possono risultare più appropriati per le sostanze chimiche che non richiedono una valutazione multigenerazionale o per le sostanze chimiche che non sono potenzialmente in grado di alterare il sistema endocrino (1). Il medaka giapponese è la specie appropriata da utilizzare in questo metodo di prova data la brevità del suo ciclo vitale e la possibilità di determinarne il sesso genetico (2), che è considerata una componente essenziale di questo metodo di prova. I metodi specifici e gli endpoint di osservazione descritti in questo metodo si applicano esclusivamente al medaka giapponese. Altre specie ittiche di piccola taglia (ad es. il *Danio rerio*) possono essere adatte a un protocollo di prova analogo.

2. Questo metodo di prova misura diversi endpoint biologici. Esso riguarda principalmente i potenziali effetti negativi sui parametri pertinenti per la popolazione, fra cui sopravvivenza, sviluppo macroscopico, crescita e riproduzione. In secondo luogo, al fine di disporre di dati meccanicistici e di stabilire collegamenti tra i risultati di altri tipi di studi sul campo e di laboratorio, se esistono prove che stabiliscono *a posteriori* che una sostanza chimica è un interferente endocrino potenziale (ad es. svolge attività androgenica o estrogenica in altre prove o saggi), allora altre informazioni utili si ottengono misurando l'mRNA della *vitellogenina (vtg)* (o la proteina vitellogenina, VTG), i caratteri sessuali secondari (CSS) fenotipici legati al sesso genetico e procedendo a una valutazione istopatologica. Va notato che se una sostanza chimica in esame o i suoi metaboliti non sono sospettati di essere interferenti endocrini, può non essere necessario misurare questi endpoint secondari e possono risultare più appropriati studi che richiedono meno risorse e un minor numero di animali (1). Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. A causa del numero limitato di sostanze chimiche sottoposte a prova e dei laboratori partecipanti alla validazione di questa prova piuttosto complessa, si prevede che, quando sarà disponibile un numero sufficiente di studi per accertare l'impatto di questo nuovo disegno sperimentale, il metodo di prova sarà riesaminato e, se necessario, riveduto alla luce dell'esperienza acquisita. I dati possono essere utilizzati al livello 5 del quadro concettuale dell'OCSE per la prova e la valutazione degli interferenti endocrini (3). Il metodo di prova inizia esponendo pesci adulti (generazione F0) alla sostanza chimica in esame nella fase di riproduzione. L'esposizione continua durante lo sviluppo e la riproduzione nella generazione F1 e durante la schiusa nella generazione F2; in questo modo la prova permette di valutare le vie endocrine strutturali e attivazionali. Nell'interpretare gli endpoint endocrini si può adottare un approccio basato sul peso dell'evidenza.
4. La prova deve comprendere un numero adeguato di individui per assicurare una potenza sufficiente per la valutazione degli endpoint pertinenti per la riproduzione (cfr. l'appendice 3), garantendo nel contempo che il numero di animali utilizzati sia il minimo necessario per motivi di benessere degli animali. Considerato il numero elevato di animali utilizzati nella prova, è importante valutare attentamente la necessità della prova in relazione ai dati esistenti, che potrebbero già contenere informazioni pertinenti su molti degli endpoint della prova MEOGRT. Un aiuto al riguardo può essere ottenuto dal documento dell'OCSE *Fish Toxicity Testing Framework* (1).

5. Il metodo di prova è stato elaborato principalmente per distinguere gli effetti di un'unica sostanza. Se tuttavia è richiesta una prova su una miscela, si deve considerare se fornirà risultati accettabili per i fini regolamentari previsti.
6. Prima di iniziare la prova è importante disporre di informazioni sulle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, in particolare per rendere possibile la produzione di soluzioni chimiche stabili. È inoltre necessario disporre di un metodo analitico adeguatamente sensibile per verificare le concentrazioni delle sostanze chimiche in esame.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. La prova ha inizio esponendo maschi e femmine sessualmente maturi (almeno 12 settimane dopo la fecondazione), riuniti in coppie riproduttrici, per 3 settimane, durante le quali la sostanza chimica in esame è distribuita nell'organismo della generazione parentale (F0) in base al suo comportamento tossicocinetico. Il primo giorno della quarta settimana, o quanto più vicino possibile a tale data, si raccolgono le uova per avviare la generazione F1. Durante l'allevamento della generazione F1 (un totale di 15 settimane) sono valutati il tasso di schiusa e di sopravvivenza. Inoltre 9-10 settimane dopo la fecondazione si prelevano campioni di pesci per gli endpoint di sviluppo e si valuta l'ovodeposizione per tre settimane, tra la 12^a e la 14^a settimana dopo la fecondazione. Una generazione F2 è avviata dopo la terza settimana di valutazione della riproduzione ed è allevata fino al completamento della schiusa delle uova.

CRITERI DI VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Si applicano i seguenti criteri di validità della prova:
 - la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 60 % del valore di saturazione in aria durante tutta la prova;
 - la temperatura media dell'acqua per tutta la durata dello studio deve essere compresa fra 24 e 26 °C. Brevi scarti dalla media in singole vasche non devono superare i 2 °C;
 - la fecondità media dei controlli in ciascuna delle generazioni (F0 e F1) deve essere superiore a 20 uova per coppia al giorno. La fertilità di tutte le uova prodotte durante la valutazione deve essere superiore all'80 %. Inoltre 16 delle 24 coppie riproduttrici di controllo raccomandate (> 65 %) devono produrre più di 20 uova per coppia al giorno;
 - il tasso di schiusa delle uova deve essere ≥ 80 % (in media) nei controlli (in ciascuna delle generazioni F1 e F2);

- la sopravvivenza dopo la schiusa fino a 3 settimane dopo la fecondazione e da 3 settimane dopo la fecondazione fino alla soppressione non cruenta per la generazione F1 (ossia 15 settimane dopo la fecondazione) deve essere, rispettivamente, $\geq 80\%$ (media) e $\geq 90\%$ (media) nei controlli (F1);
- i dati disponibili devono dimostrare che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del $\pm 20\%$ dei valori medi misurati.

Per quanto riguarda la temperatura dell'acqua, anche se non costituisce un criterio di validità, le repliche all'interno di un trattamento non devono essere statisticamente diverse le une dalle altre e i gruppi trattati nell'ambito della prova non devono essere statisticamente diversi gli uni dagli altri (sulla base di una misurazione quotidiana delle temperature ed esclusi scarti di breve durata).

9. Benché si possa osservare un calo della riproduzione nei gruppi esposti alle concentrazioni più elevate, la riproduzione deve essere sufficiente, almeno nel terzo gruppo più esposto e in tutti i gruppi meno esposti della F0, per riempire gli incubatori di schiusa. Inoltre la sopravvivenza embrionale nel terzo gruppo più esposto e nei gruppi meno esposti della generazione F1 deve essere tale da consentire la valutazione degli endpoint al momento del campionamento subadulto (cfr. i paragrafi 36 e 38 e l'appendice 9). Inoltre si deve osservare almeno una minima sopravvivenza post-schiusa ($\sim 20\%$) nel secondo gruppo più esposto della F1. Questi non costituiscono di per sé criteri di validità, ma raccomandazioni intese a consentire il calcolo delle concentrazioni senza effetti osservabili (NOEC) su basi solide.
10. Se si registra una deviazione rispetto ai criteri di validità della prova, le conseguenze devono essere analizzate in relazione all'attendibilità dei risultati della prova e tali deviazioni e considerazioni devono essere incluse nella relazione sulla prova.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

11. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

- a) misuratori dell'ossigeno e del pH;
- b) attrezzatura per la determinazione della durezza e dell'alcalinità dell'acqua;
- c) apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura e preferibilmente per il monitoraggio continuo;
- d) vasche in materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata in relazione al carico e alla densità di popolazione raccomandati (cfr. appendice 3);

e) bilancia sufficientemente precisa (precisione di $\pm 0,5$ mg).

Acqua

12. Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie sperimentale dimostri di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua deve essere costante per tutta la durata della prova. Per escludere l'eventualità che l'acqua di diluizione influisca indebitamente sui risultati della prova (ad esempio, per complessazione della sostanza chimica in esame) o abbia effetti negativi sui pesci riproduttori, si prelevano periodicamente dei campioni per analizzarla. La misurazione dei metalli pesanti (ad es. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (ad es. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), dei pesticidi, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata, ad esempio, ogni sei mesi, quando sia noto che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 2. Il pH dell'acqua deve essere compreso tra 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di $\pm 0,5$ unità di pH.

Sistema di esposizione

13. Il disegno e i materiali utilizzati per il sistema di esposizione non sono specificati. Per la costruzione del sistema di prova si devono utilizzare vetro, acciaio inossidabile o altri materiali chimicamente inerti che non siano stati contaminati in prove precedenti. Ai fini della presente prova un sistema di esposizione adeguato potrà essere costituito da un sistema a flusso continuo (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Soluzioni di prova

14. La soluzione madre della sostanza chimica in esame deve essere introdotta nel sistema di esposizione mediante una pompa adeguata. La portata del flusso della soluzione madre deve essere calibrata secondo i dati analitici delle soluzioni di prova prima dell'inizio dell'esposizione e formare oggetto di un controllo volumetrico periodico durante la prova. La soluzione di prova in ogni vasca è rinnovata secondo il bisogno (ad es. minimo 5 rinnovi in volume/giorno fino a 16 rinnovi in volume/giorno o un flusso fino a 20 ml/min) in funzione della stabilità della sostanza chimica in esame e della qualità dell'acqua.

15. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre è di preferenza preparata semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne/sistemi di saturazione o metodi di dosaggio

passivo (14). Si deve tuttavia cercare, in via prioritaria, di evitare solventi e altri vettori, in quanto: 1) alcuni solventi possono essi stessi rivelarsi tossici e/o indurre risposte indesiderate o inattese, 2) testare le sostanze chimiche a una concentrazione superiore alla loro solubilità in acqua (il che avviene spesso se si usano solventi) può falsare la determinazione delle concentrazioni efficaci, 3) il ricorso a solventi nelle prove a lungo termine può portare alla formazione significativa di biofilm associati all'attività microbica che può avere un impatto sulle condizioni ambientali e sulla capacità di mantenere le concentrazioni di esposizione e 4) in assenza di dati storici che dimostrino che il solvente non influisce sui risultati dello studio, l'uso di solventi necessita il trattamento con solvente di un controllo, con le relative conseguenze a livello di benessere degli animali, in quanto sono necessari animali supplementari per svolgere la prova. Nel caso di sostanze chimiche difficili da testare, il solvente può essere utilizzato soltanto come ultima istanza e si deve consultare il documento d'orientamento dell'OCSE 23 sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele "difficili" (*OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (15) per stabilire la migliore metodologia da seguire. La scelta del solvente sarà determinata dalle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame e dalla disponibilità di dati storici sull'uso del solvente. Inoltre, se si utilizza un solvente come vettore, occorre valutare idonei controlli con solvente in aggiunta ai controlli (negativi) senza solvente (solo acqua di diluizione). Nel caso in cui l'uso di un solvente sia inevitabile e si verifichi un'attività microbica (biofilm), si raccomanda di registrare/annotare la presenza di biofilm per vasca durante tutta la durata della prova. Idealmente la concentrazione di solvente deve essere mantenuta costante nel controllo con solvente e in tutti i recipienti trattati. Se la concentrazione di solvente non è mantenuta costante, nel controllo con solvente deve essere utilizzata la concentrazione di solvente più elevata nel recipiente trattato. Nei casi in cui si utilizza un solvente come vettore, la concentrazione massima del solvente non deve superare 100 µl/l o 100 mg/l (15) e si raccomanda di mantenere la concentrazione del solvente più bassa possibile (ad es. < 20 µl/l) per evitare il potenziale effetto del solvente sugli endpoint misurati (16).

Animali sperimentali

Selezione e mantenimento dei pesci

16. La specie sperimentale è il medaka giapponese *Oryzias latipes* a motivo del ciclo vitale breve e della possibilità di determinare il sesso genetico. Anche se altre specie ittiche di piccola taglia possono essere adatte a un protocollo sperimentale analogo, i metodi specifici e gli endpoint di osservazione descritti in questo metodo di prova si applicano esclusivamente al medaka giapponese (cfr. il paragrafo 1). Il medaka si presta bene alla riproduzione in cattività; sono stati pubblicati metodi per la sua coltura (17) (18) (19) e sono disponibili dati di prove sulla letalità a breve termine, sui primi stadi di vita e sul ciclo vitale completo (5) (6) (8) (9) (20). Tutti i pesci sono soggetti a un fotoperiodo di 16

ore di luce e 8 ore di buio. Essi sono nutriti con naupli di artemia vivi *Artemia* spp., integrati, se necessario, con mangime in fiocchi disponibile in commercio. Il mangime in fiocchi disponibile in commercio deve essere periodicamente analizzato per rilevare la presenza di eventuali contaminanti.

17. Purché siano seguite pratiche di allevamento adeguate, non è necessario un protocollo di coltura specifico. Ad esempio, i medaka possono essere allevati in vasche da 2 l con 240 larve per vasca fino a 4 settimane dopo la fecondazione e poi possono essere allevati in vasche da 2 l con 10 pesci per vasca fino a 8 settimane dopo la fecondazione; a questo punto le coppie riproduttrici sono trasferite in vasche da 2 l.

Acclimatazione e selezione dei pesci

18. I pesci da utilizzare nella prova vanno selezionati da un unico ceppo di laboratorio che sia stato acclimatato per almeno due settimane prima della sperimentazione in condizioni di qualità dell'acqua e di illuminazione simili a quelle usate durante la prova (NB: tale periodo di acclimatazione non è un periodo di pre-esposizione in situ). Si raccomanda che i pesci provengano dal laboratorio che esegue la prova, in quanto il trasporto è un fattore di stress per i pesci adulti e può interferire con una ovodeposizione affidabile. I pesci devono essere nutriti due volte al giorno con naupli di artemia, integrati da mangime in fiocchi disponibile in commercio, se necessario, per tutto il periodo del mantenimento e nella fase di esposizione. Per avviare questa prova si considera necessario un minimo di 42 coppie riproduttrici (54 coppie riproduttrici se è richiesto un controllo con solvente a causa, in parte, della mancanza di dati storici a sostegno dell'uso del solo controllo con solvente) al fine di garantire una replica adeguata. Per ogni coppia riproduttrice di F0 si deve inoltre verificare che si tratti di una coppia XX-XY (ossia che presenti la configurazione normale di cromosomi sessuali per ogni sesso) per evitare la possibile inclusione di maschi spontanei XX (cfr. il paragrafo 39).

19. Nella fase di acclimatazione la mortalità nella coltura di pesci deve essere registrata e i seguenti criteri sono applicati al termine di un periodo di adattamento di 48 ore:

- mortalità superiore al 10 % della popolazione in coltura nei sette giorni che precedono il trasferimento al sistema di prova: respingere l'intero lotto;
- mortalità compresa fra il 5 % e il 10 % della popolazione nei sette giorni che precedono il trasferimento al sistema di prova: sette giorni supplementari di acclimatazione da aggiungere al periodo di acclimatazione di due settimane; se nel corso della seconda settimana la mortalità supera il 5 %, respingere l'intero lotto;
- mortalità inferiore al 5 % della popolazione nei sette giorni che precedono il trasferimento al sistema di prova: accettare il lotto.

20. I pesci non devono essere sottoposti a trattamenti per patologie durante il periodo di acclimatazione di due settimane che precede la prova e durante il periodo di esposizione e il trattamento di patologie deve essere evitato completamente, se possibile. I pesci che mostrano segni clinici di patologie non possono essere utilizzati nello studio. È necessario registrare le osservazioni e gli eventuali trattamenti profilattici e terapeutici durante il periodo di coltura che precede la prova.
21. La fase di esposizione deve iniziare con pesci adulti sessualmente dimorfici e geneticamente sessuati, provenienti da una popolazione allevata in laboratorio di animali sessualmente maturi allevati a 25 ± 2 °C. I pesci devono essere identificati come riproduttori comprovati (ossia che hanno prodotto una progenie vitale) nella settimana che precede l'esposizione. All'inizio della prova l'intervallo di peso in funzione del sesso dell'intero gruppo di pesci utilizzato per la prova deve essere mantenuto entro un margine di ± 20 % della media aritmetica del peso per lo stesso sesso. Occorre pesare un sottocampione di pesci prima della prova per stimare il peso medio. I pesci selezionati devono avere un'età di almeno 12 settimane dopo la fecondazione e avere un peso di ≥ 300 mg per le femmine e di ≥ 250 mg per i maschi.

DISEGNO SPERIMENTALE

Concentrazioni di prova

22. Si raccomanda di utilizzare cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame oltre a o ai controlli. Tutte le fonti di informazione devono essere considerate quando si seleziona la gamma delle concentrazioni di prova, compresi le relazioni quantitative struttura-attività (QSAR), i metodi *read-across* utilizzati con sostanze analoghe, i risultati di prove su pesci come i saggi di mortalità acuta (capitolo C.1 del presente allegato), il saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci (capitolo C.48 del presente allegato) e altri metodi di prova, ad es. i capitoli C.15, C.37, C.41, C.47 o C.49 del presente allegato (21) (22) (23) (24) (25) (26), se tali dati sono disponibili, o, se necessario, i risultati di un test di definizione dell'intervallo delle concentrazioni (*range-finding test*) che comprenda eventualmente una fase di riproduzione. Se necessario, la prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni può essere effettuata in condizioni (qualità dell'acqua, sistema di prova, carico animale) analoghe a quelle della prova finale. Nel caso in cui sia necessario utilizzare un solvente e non si disponga di dati storici, la prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni può essere utilizzata per individuare l'adeguatezza del solvente. La concentrazione massima di prova non deve superare la solubilità dell'acqua, 10 mg/l o 1/10 della LC₅₀ a 96 h (27). La concentrazione minima deve essere da 10 a 100 volte più bassa della concentrazione massima. L'uso di cinque concentrazioni in questa prova non solo consente di misurare le relazioni dose-risposta, ma

fornisce anche la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*)) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC - *No Observed Effect Concentration*), che sono necessarie per una valutazione dei rischi in alcuni programmi di natura normativa o contesti giuridici. In genere, il fattore di distanza tra le concentrazioni nominali della sostanza chimica in esame tra livelli di trattamento adiacenti è $\leq 3,2$.

Repliche nei gruppi trattati e di controllo

23. Occorre utilizzare un minimo di sei vasche di prova repliche per concentrazione di prova (cfr. l'appendice 7). Nella fase riproduttiva (tranne che per la generazione F0) la struttura di replica è raddoppiata per la valutazione della fecondità e ogni replica comporta un'unica coppia riproduttrice (cfr. il paragrafo 42).
24. Un controllo con l'acqua di diluizione e, se necessario, un controllo con solvente devono essere inclusi nella prova in aggiunta alle concentrazioni della sostanza chimica in esame. Un numero doppio di vasche di replica deve essere utilizzato per i controlli al fine di garantire una potenza statistica sufficiente (ossia dovranno essere utilizzate almeno dodici repliche per i controlli). Nella fase riproduttiva il numero di repliche nei controlli è raddoppiato (ossia un minimo di 24 repliche e ogni replica comporta un'unica coppia riproduttrice). Dopo la riproduzione le repliche di controllo non devono contenere più di 20 embrioni (pesci).

PROCEDURA

Inizio della prova

25. I pesci adulti riproduttori utilizzati per dare inizio alla generazione F0 della prova sono selezionati sulla base di due criteri: età (generalmente più di 12 settimane dopo la fecondazione ma preferibilmente non più di 16) e peso (deve essere ≥ 300 mg per le femmine e ≥ 250 mg per i maschi).
26. Le coppie maschio-femmina che rispondono ai criteri di cui sopra sono trasferite singolarmente in ciascuna vasca di replica, ossia dodici repliche per i controlli e sei repliche per i gruppi sottoposti a trattamento con la sostanza chimica in esame all'inizio della prova. Le vasche sono casualmente assegnate a un trattamento (ad es., T1-T5 e controllo) e a una replica (ad es., A-L controlli e A-F trattati) e sono quindi poste nel sistema di esposizione con un flusso appropriato per ogni vasca.

Condizioni di esposizione

27. Nell'appendice 3 figura una sintesi completa dei parametri e delle condizioni della prova. Il rispetto di tali specifiche dovrebbe portare a pesci di controllo con valori di endpoint simili a quelli elencati nell'appendice 4.
28. Durante la prova l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura devono essere misurati in almeno una vasca di prova per ciascun gruppo trattato e il controllo. Queste misurazioni, salvo la temperatura, devono essere effettuate come minimo una volta alla settimana per tutto il periodo di esposizione. La temperatura media dell'acqua per tutta la durata della prova deve essere compresa fra 24 e 26 °C. La temperatura deve essere misurata ogni giorno per tutto il periodo di esposizione. Il pH dell'acqua deve essere compreso entro 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di $\pm 0,5$ unità di pH. Le repliche all'interno di un trattamento non devono essere statisticamente diverse le une dalle altre e i gruppi trattati nell'ambito della prova non devono essere statisticamente diversi gli uni dagli altri (sulla base di una misurazione quotidiana delle temperature ed esclusi scarti di breve durata).

Durata dell'esposizione

29. La prova espone pesci della F0 sessualmente atti alla riproduzione per tre settimane. Nella settimana 4, all'incirca al 24° giorno della prova, la F1 è costituita e le coppie riproduttrici della F0 sono soppresse con metodi non cruenti e il loro peso e lunghezza sono registrati (cfr. il paragrafo 34). La generazione F1 è in seguito esposta per altre 14 settimane (totale di 15 settimane per F1) e la generazione F2 è esposta per due settimane fino alla schiusa. La durata totale della prova è in linea di massima di 19 settimane (ossia fino alla schiusa di F2). La cronologia della prova è indicata nella tabella 2 e spiegata in dettaglio nell'appendice 9.

Regime alimentare

30. I pesci possono essere alimentati *ad libitum* con naupli di artemia di 24 ore (*Artemia* spp.), integrati, se necessario, da mangime in fiocchi disponibile in commercio. Il mangime in fiocchi disponibile in commercio deve essere periodicamente analizzato per individuare l'eventuale presenza di contaminanti quali pesticidi organoclorurati, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e policlorobifenili (PCB). Vanno evitati alimenti con un livello elevato di sostanze attive a livello endocrino (ossia fitoestrogeni) in quanto potrebbero pregiudicare la risposta della prova. Il cibo avanzato e il materiale fecale vanno rimossi dalle vasche secondo la necessità, ad esempio pulendo con cura il fondo di ciascuna vasca con un sifone. Inoltre i lati e il fondo di ogni vasca devono essere puliti una o due volte alla settimana (ad esempio raschiando con una spatola). Nell'appendice 5 figura un esempio di programma di alimentazione. La frequenza di alimentazione si basa sul numero di pesci per replica. Essa è pertanto ridotta se si verificano casi di mortalità in una replica.

Misurazioni e determinazioni analitiche

31. Prima che inizi il periodo di esposizione va verificato il buon funzionamento del sistema di distribuzione della sostanza chimica in esame. Vanno stabiliti tutti i metodi analitici necessari, comprese sufficienti conoscenze sulla stabilità della sostanza chimica in esame nel sistema di prova. Durante la prova le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate a intervalli idonei, preferibilmente almeno una volta alla settimana in una replica per ogni gruppo trattato, con rotazione settimanale fra le repliche dello stesso gruppo trattato.
32. Durante la prova la portata del flusso del diluente e della soluzione madre devono essere verificate a intervalli regolari (ad es. almeno tre volte alla settimana). Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo di $\pm 20\%$ dei valori medi misurati, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati. Nel caso di sostanze chimiche che si accumulano sensibilmente nei pesci, le concentrazioni di prova possono diminuire man mano che i pesci crescono. In tali casi si raccomanda di adattare il tasso di rinnovamento della soluzione di prova in ogni vasca al fine di mantenere le concentrazioni di prova il più costanti possibile.

Osservazioni e endpoint misurati

33. Gli endpoint misurati comprendono fecondità, fertilità, schiusa, crescita e sopravvivenza per valutare possibili effetti a livello di popolazione. Occorre inoltre osservare quotidianamente il comportamento e annotare eventuali comportamenti insoliti. Altri endpoint meccanicistici comprendono i livelli dell'mRNA della *vgt* epatica o proteina VTG mediante immunodosaggio (28), i marcatori sessuali fenotipici come le papille della pinna anale caratteristiche del maschio, la valutazione istologica del sesso gonadico e la valutazione istopatologica di reni, fegato e gonadi (cfr. elenco degli endpoint nella tabella 1). Tutti questi endpoint specifici sono valutati nel contesto della determinazione del sesso genetico dell'individuo, basata sulla presenza o assenza del gene *dmy* che determina il sesso maschile nel medaka (cfr. il paragrafo 41). Deve essere valutato anche il tempo di deposizione. Inoltre semplici rapporti numerici tra i sessi fenotipici possono essere stabiliti sulla base delle informazioni ricavate dal conteggio delle papille della pinna anale per definire singoli medaka come maschi o femmine fenotipici. Questo metodo di prova non è atto a individuare deviazioni modeste dal rapporto numerico tra i sessi atteso in quanto il numero relativamente scarso di pesci per replica non offre sufficiente potenza statistica. Inoltre nel corso della valutazione istopatologica è valutata la gonade e sono condotte analisi molto più potenti per valutare il fenotipo gonadico nel contesto del sesso genetico.

34. Scopo principale di questo metodo di prova è valutare gli effetti potenziali a livello di popolazione di una sostanza chimica in esame. Gli endpoint meccanicistici (VTG, CSS e taluni effetti istopatologici che interessano le gonadi) possono anche contribuire a determinare se esiste un effetto mediato da un'attività endocrina. Tali endpoint meccanicistici possono tuttavia essere influenzati anche da una tossicità sistemica o di altro tipo. Anche l'istopatologia epatica e renale può pertanto essere valutata in dettaglio per aiutare a meglio comprendere le eventuali risposte negli endpoint meccanicistici. Tuttavia, anche se queste valutazioni precise non sono effettuate, le anomalie macroscopiche osservate incidentalmente durante la valutazione istopatologica devono comunque essere annotate nella relazione sulla prova.

Soppressione incruenta dei pesci

35. Al termine dell'esposizione delle generazioni F0 e F1, quando è prelevato un sottocampione di pesci subadulti, i pesci devono essere sottoposti a soppressione incruenta con quantità adeguate di soluzione anestetica (ad esempio metan sulfonato di tricaina, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) tamponata con 300 mg/l di NaHCO₃ (bicarbonato di sodio, CAS.144-55-8) per ridurre l'irritazione della mucosa. Se i pesci presentano segni di manifesta sofferenza (cioè elevatissime sofferenze e probabile morte) o sono moribondi, gli animali devono essere anestetizzati e soppressi con metodi non cruenti e trattati come casi di mortalità ai fini dell'analisi dei dati. Se un pesce viene soppresso per moribondità, ciò viene annotato nella relazione sulla prova. A seconda del momento durante la prova in cui il pesce è soppresso, l'animale può essere conservato per l'analisi istopatologica (mantenendolo in fissativo per un'eventuale esame istopatologico).

Manipolazione delle uova e delle larve

Raccolta delle uova delle coppie riproduttrici a fini di riproduzione della generazione successiva

36. Le uova sono raccolte il primo giorno (o i primi due giorni, se necessario) della settimana di prova 4 da F0 a F1 e della settimana di prova 18 da F1 a F2. La settimana di prova 18 corrisponde a pesci adulti F1 di età pari a 15 settimane dopo la fecondazione. È importante che tutte le uova siano rimosse da ogni vasca il giorno prima dell'inizio della raccolta per essere certi che tutte le uova raccolte da una coppia riproduttrice provengano dalla stessa deposizione. Dopo la deposizione le femmine di medaka talvolta trasportano le loro uova vicino alla cloaca in attesa di poterle deporre su un substrato. In assenza di un substrato nella vasca, le uova si trovano attaccate alla femmina o sul fondo della vasca. In funzione della loro localizzazione, le uova sono prelevate con precauzione dalla femmina o sifonate dal fondo della vasca nella settimana di prova 4 di F0 e nella settimana di prova 18 di F1.

Tutte le uova raccolte nell'ambito di un trattamento sono riunite prima di essere distribuite negli incubatori.

37. I filamenti che tengono insieme le uova deposte devono essere rimossi. Le uova fecondate (fino a 20) sono raccolte da ciascuna coppia riproduttrice (1 coppia per replica), raggruppate per trattamento e distribuite in modo sistematico negli incubatori appropriati (appendici 6 e 7). Utilizzando un microscopio a dissezione di buona qualità si possono osservare i segni distintivi dell'inizio della fecondazione/dello sviluppo quali il rigonfiamento della membrana di fecondazione (corio), la divisione cellulare in corso o la formazione della blastula. Gli incubatori possono essere posti in "acquari incubatori" distinti per ogni trattamento (nel qual caso vanno misurati i parametri di qualità dell'acqua e le concentrazioni della sostanza chimica in esame) o nella vasca delle repliche che conterrà le larve schiuse (ad esempio eleuteroembrioni). Se è necessario un secondo giorno di raccolta (23° giorno di prova), tutte le uova di entrambi i giorni devono essere riunite e distribuite sistematicamente tra le repliche di trattamento.

Allevamento delle uova fino alla schiusa

38. Le uova fecondate sono agitate costantemente, ad esempio mediante bolle d'aria nell'incubatore o agitando verticalmente l'incubatore. La mortalità delle uova fecondate (embrioni) è controllata e registrata quotidianamente. Le uova morte sono eliminate dagli incubatori (appendice 9). Il 7° giorno successivo alla fecondazione l'agitazione cessa o è ridotta in modo che le uova fecondate si depositino sul fondo dell'incubatore. Questo favorisce la schiusa, che avviene generalmente entro uno o due giorni. Per ciascun trattamento e controllo si contano le larve (giovani larve, eleuteroembrioni) (raggruppando le repliche). Le uova fecondate che non si sono schiuse entro il doppio del giorno mediano di schiusa nel controllo (generalmente tra 16 e 18 giorni dopo la fecondazione) sono considerate non vitali e scartate.
39. Dodici larve sono trasferite in ogni vasca di replica. Le larve provenienti dagli incubatori sono raggruppate e distribuite in modo sistematico nelle vasche di replica (appendice 7). A tal fine si può selezionare casualmente una larva dall'insieme delle larve trattate e aggiungere in modo sequenziale una larva estratta a sorte in una vasca per repliche. Ogni vasca deve contenere lo stesso numero ($n=12$) di larve schiuse (massimo 20 larve per vasca). Se non vi sono larve a sufficienza per riempire tutte le repliche di trattamento si raccomanda di fare in modo che quante più repliche possibili dispongano di 12 larve. Le larve possono essere manipolate in sicurezza con pipette in vetro di diametro ampio. Le larve in sovrannumero sono sopresse in modo non cruento con un anestetico. Nelle settimane che precedono la formazione delle coppie riproduttrici il giorno in cui è osservata la prima deposizione per ogni replica deve essere registrato.

Formazione delle coppie riproduttrici

Prelievo tissutale a livello della pinna e determinazione del sesso genotipico

40. La determinazione del sesso genotipico mediante prelievo tissutale a livello della pinna è effettuata a 9-10 settimane dopo la fecondazione (ossia nella settimana di prova 12-13 per la generazione F1). Tutti i pesci di una vasca sono anestetizzati (utilizzando metodi approvati, ad esempio IACUC) e un piccolo campione di tessuto è prelevato all'estremità dorsale o ventrale della pinna caudale di ogni pesce per determinare il sesso genotipico dell'individuo (29). I pesci di una replica possono essere posti in piccole gabbie, possibilmente uno per gabbia, nella vasca di replica. In alternativa è possibile alloggiare due pesci in ogni gabbia se si possono distinguere uno dall'altro. A tale scopo si può tagliare in modo diverso la pinna caudale al momento del prelievo tissutale (ad esempio praticare un taglio all'estremità dorsale e l'altro all'estremità ventrale).
41. Il sesso genotipico del medaka è determinato da un gene identificato e sequenziato (*dmy*) situato sul cromosoma Y. La presenza di *dmy* indica che si tratta di un individuo XY indipendentemente dal fenotipo, mentre l'assenza di *dmy* indica che si tratta di un individuo XX indipendentemente dal fenotipo (30) (31). L'acido deossiribonucleico (DNA) è estratto da ciascun tessuto prelevato e la presenza o l'assenza di *dmy* è determinata mediante il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR) (si veda l'appendice 9 nel capitolo C.41 del presente allegato o le appendici 3 e 4 in (29).

Formazione delle coppie riproduttrici

42. Le informazioni sul sesso genotipico sono utilizzate per formare le coppie riproduttrici XX-XY a prescindere dal fenotipo esterno, che può essere modificato dall'esposizione alla sostanza chimica in esame. Il giorno successivo alla determinazione del sesso genotipico di ciascun pesce due pesci XX e due pesci XY da ogni replica sono selezionati in modo casuale e due coppie riproduttrici XX-XY sono formate. Se una replica non dispone di due pesci XX o due pesci XY, occorre procurarsi pesci adeguati da altre repliche nell'ambito del trattamento. La priorità è disporre del numero raccomandato di repliche di coppie riproduttrici (12) in ogni trattamento e nei controlli (24). I pesci che presentano anomalie apparenti (problemi di vescica natatoria, deformazioni spinali, dimensioni estreme, ecc.) sono da scartare al momento della formazione delle coppie riproduttrici. Nella fase riproduttiva di F1 ogni vasca di replica deve contenere una sola coppia riproduttrice.

Campionamento di subadulti e valutazione degli endpoint

Campionamento di coppie non riproduttrici

43. Dopo la formazione delle coppie riproduttrici i pesci non selezionati per la riproduzione sono soppressi con metodi non cruenti per misurare gli endpoint subadulti nella settimana

di prova 12-13 (F1). È estremamente importante manipolare i pesci in modo che il sesso genotipico determinato per la selezione delle coppie riproduttrici possa ancora essere tracciato per ogni singolo pesce. Tutti i dati raccolti sono analizzati nel contesto del sesso genotipico di un individuo specifico. Ogni pesce è utilizzato per misurare una serie di endpoint, fra cui: la determinazione dei tassi di sopravvivenza dei pesci giovani/pesci subadulti (settimane di prova 7-12/13) (F1), la crescita in lunghezza (è possibile misurare la lunghezza standard se la pinna caudale è stata accorciata a seguito del campionamento per la determinazione del sesso genetico). La lunghezza totale può essere misurata solo se è stata prelevata una porzione, dorsale o ventrale, della pinna caudale, per *dmy*) e la massa corporea (ossia il peso umido, secco), l'mRNA della *vtg* epatica (o della VTG) e le papille della pinna anale (cfr. le tabelle 1 e 2). Va notato che sono necessari anche i pesi e le lunghezze delle coppie riproduttrici per calcolare la crescita media in un gruppo trattato.

Prelievo tissutale e misurazione della vitellogenina

44. Il fegato è dissezionato e deve essere conservato a ≤ -70 °C fino alla misurazione dell'mRNA della *vtg* (o della VTG). La coda del pesce, inclusa la pinna anale, è conservata in un fissativo appropriato (ad esempio di Davidson) o fotografata in modo che sia possibile contare le papille della pinna anale in un momento successivo. Se lo si desidera, in questa fase possono essere prelevati e conservati altri tessuti (ad esempio, gonadi). La concentrazione della VTG epatica deve essere quantificata mediante una tecnica ELISA omologa (cfr. le procedure raccomandate per il medaka nell'appendice 6 del capitolo C.48 del presente allegato). Per quantificare l'mRNA della *vtg* si possono utilizzare metodi alternativi, messi a punto dall'U.S EPA (29), consistenti nell'estrazione dell'mRNA del gene *vtg I* di un campione epatico e nella quantificazione del numero di copie del gene *vtg I* (per ng dell'mRNA totale) mediante PCR quantitativa. Invece di determinare il numero di copie del gene *vtg* nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati, un metodo meno dispendioso dal punto di vista delle risorse e meno difficile dal punto di vista tecnico consiste nel determinare il cambiamento relativo (fattore moltiplicatore) nell'espressione del gene *vtg I* nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati.

Caratteri sessuali secondari

45. In circostanze normali solo i medaka maschi sessualmente maturi presentano delle papille, che si sviluppano sui segmenti congiunti di alcuni raggi della pinna anale e costituiscono un carattere sessuale secondario che può servire da biomarcatore per gli effetti nocivi sul sistema endocrino. Il metodo per contare le papille della pinna anale (numero di segmenti congiunti con papille) è indicato nell'appendice 8. Il numero di papille della pinna anale per individuo è utilizzato anche per classificare gli individui come fenotipo esterno maschile o femminile ai fini del calcolo di un semplice rapporto numerico tra i sessi per

ogni replica. Un medaka con un numero di papille superiore a 0 è definito come maschio; un medaka con 0 papille è definito come femmina.

Valutazione della fecondità e della fertilità

46. La fecondità e la fertilità sono valutate nelle settimane di prova da 1 a 3 nella generazione F0 e nelle settimane di prova da 15 a 17 nella generazione F1. Le uova sono raccolte quotidianamente da ogni coppia riproduttrice per 21 giorni consecutivi. Sono rimosse delicatamente dalle femmine (poste in un retino) e/o sifonate dal fondo della vasca tutte le mattine. Fecondità e fertilità sono registrate ogni giorno per ciascuna coppia riproduttrice replica. La fecondità è definita come il numero di uova deposte e la fertilità è definita funzionalmente come il numero di uova fecondate e vitali al momento del conteggio. Il conteggio deve essere effettuato il prima possibile dopo la raccolta delle uova.
47. La fecondità delle repliche è registrata quotidianamente ed è intesa come il numero di uova per coppia riproduttrice analizzato mediante le procedure statistiche raccomandate utilizzando le medie delle repliche. La fertilità delle repliche è data dalla somma del numero di uova fertili prodotte da una coppia riproduttrice divisa per la somma del numero di uova prodotte da tale coppia. Statisticamente la fertilità è analizzata come un rapporto per replica. Il tasso di schiusa delle repliche è dato dal numero di larve diviso per il numero di embrioni caricati (generalmente 20). Statisticamente il tasso di schiusa è analizzato come un rapporto per replica.

Campionamento di adulti e valutazione degli endpoint

Campionamento di coppie riproduttrici

48. Dopo la settimana di prova 17 (ossia dopo che la generazione F2 è stata avviata con successo) gli adulti F1 sono soppressi con metodi non cruenti e vari endpoint sono misurati (cfr. le tabelle 1 e 2). Si ottiene un'immagine della pinna anale e la si esamina per valutare le papille (cfr. l'appendice 8) e/o la coda è rimossa a livello immediatamente posteriore alla cloaca e fissata per un conteggio successivo delle papille. Se lo si desidera, in questa fase una parte della pinna caudale può essere prelevata e archiviata per la verifica del sesso genetico (*dmy*). Se necessario, può essere prelevato un campione tissutale per ripetere l'analisi del *dmy* e verificare il sesso genetico di determinati pesci. Prima di immergere l'intero corpo nel fissativo si apre la cavità corporea per praticare una perfusione con fissativi appropriati (ad esempio di Davidson). Tuttavia se prima della fissazione è effettuata una procedura di permeabilizzazione adeguata, non è necessario aprire la cavità corporea.

Esame istopatologico

49. Tutti i pesci sono sottoposti a un esame istologico per patologie del tessuto gonadico (30); (29). Come indicato al paragrafo 33, altri endpoint meccanicistici valutati in questo metodo di prova (ossia VTG, CSS e taluni effetti istopatologici gonadici) possono essere influenzati da una tossicità sistemica o di altro tipo. Anche l'istopatologia epatica e renale può pertanto essere valutata in dettaglio per aiutare a meglio comprendere le eventuali risposte negli endpoint meccanicistici. Tuttavia, anche se queste valutazioni precise non sono effettuate, le anomalie macroscopiche osservate incidentalmente durante la valutazione istopatologica devono comunque essere annotate nella relazione sulla prova. Si può considerare una lettura "dall'alto verso il basso" dal gruppo più esposto (rispetto al controllo) fino al trattamento senza effetto; si raccomanda tuttavia di consultare il documento di orientamento di istopatologia (29). Generalmente tutti i campioni sono preparati/sezionati prima di essere esaminati dal patologo. Se si utilizza un approccio "dall'alto verso il basso" si nota che la procedura Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) è fondata sull'aspettativa che con l'aumento dei livelli di dose aumenti anche l'impatto biologico (la patologia). Pertanto si perde potenza se si considera solo un'unica dose elevata senza dosi intermedie. Se non è necessaria un'analisi statistica per determinare che la dose elevata non ha effetto, questo approccio può essere accettabile. Anche il fenotipo gonadico è determinato da questa valutazione.

Altre osservazioni

50. La prova MEOGRT fornisce dati utilizzabili (ad esempio in un approccio basato sul peso delle prove) per valutare contemporaneamente almeno due tipi generali di meccanismi d'azione degli effetti avversi (AOP) che producono effetti a livello di riproduzione: a) meccanismi a mediazione endocrina che comportano una perturbazione dell'asse endocrino ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG); e b) meccanismi che provocano una riduzione della sopravvivenza, della crescita (lunghezza e peso) e della riproduzione a causa di una tossicità a mediazione non endocrina. Anche endpoint generalmente misurati in prove di tossicità cronica quali la prova sul ciclo vitale completo e la prova sui primi stadi di vita sono compresi nella presente prova e possono essere utilizzati per valutare i pericoli posti sia da meccanismi di azione tossici a mediazione non endocrina sia da meccanismi di tossicità a mediazione endocrina. Durante la prova occorre inoltre osservare quotidianamente i comportamenti e prendere nota di eventuali comportamenti insoliti. Inoltre si devono registrare i decessi e calcolare la sopravvivenza fino alla selezione dei pesci (settimana di prova 6/7), la sopravvivenza dopo la selezione fino al prelievo subadulto (9-10 settimane dopo la fecondazione) e la sopravvivenza dalla formazione delle coppie fino al campionamento dei pesci adulti.

Tabella 1: Panoramica degli endpoint del MEOGRT*

Fase di vita	Endpoint	Generazione
--------------	----------	-------------

Embrioni (2 settimane dopo la fecondazione)	Schiusa (% e tempo di schiusa)	F1, F2
Pesci giovani (4 settimane dopo la fecondazione)	Sopravvivenza	F1
Subadulti (9 o 10 settimane dopo la fecondazione)	Sopravvivenza	F1
	Crescita (peso e lunghezza)	
	Vitellogenina (mRNA o proteina)	
	Caratteri sessuali secondari (papille della pinna anale)	
	Rapporto numerico tra i sessi a livello esterno	
	Termine fino alla prima deposizione	
Adulti (12-14 settimane dopo la fecondazione)	Riproduzione (fecondità e fertilità)	F0, F1
Adulti (15 settimane dopo la fecondazione)	Sopravvivenza	F1
	Crescita (peso e lunghezza)	
	Caratteri sessuali secondari (papille della pinna anale)	
	Esame istopatologico (gonadi, fegato, reni)	

*Questi endpoint devono essere oggetto di un'analisi statistica.

CRONOLOGIA

51. La tabella 2 illustra lo svolgimento cronologico della prova MEOGRT. Tale prova comprende 4 settimane di esposizione degli adulti F0, 15 settimane di esposizione della generazione F1 e un periodo di esposizione della seconda generazione (F2) fino alla schiusa (2 settimane dopo la fecondazione). L'appendice 9 riepiloga le diverse fasi dall'inizio alla fine della prova MEOGRT.

Tabella 2: Cronologia dell'esposizione e della misurazione degli endpoint nel corso della prova MEOGRT

MEOGRT - Cronologia dell'esposizione e della misurazione degli endpoint																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Settimana di	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stadio della vita					Embrione				Larva				Pesci giovani			Subadulto		Adulto	
Endpoint																			
Fecondità	F ₀														F ₁				
Fertilità	F ₀														F ₁				
Schiusa					F ₁													F ₂	
Sopravvivenza						F ₁						F ₁						F ₁	
Crescita				F ₀								F ₁						F ₁	
Vitellogenina												F ₁							
Caratteri sessuali secondari												F ₁						F ₁	
Esame istopatologico																		F ₁	
Settimana di prova	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Disegno sperimentale: 7 gruppi di repliche
 - 5 trattati con la sostanza chimica in esame
 - 2 gruppi di controllo (4 se si usa un solvente)
- Disegno intragruppo
 - 12 repliche per la riproduzione, la patologia adulta e i CSS (sett. da 10 a 18)
 - 6 repliche per la schiusa, la sopravvivenza e la Vtg e CSS e crescita subadulti (sett. da 1 a 9)

CSS: caratteri sessuali secondari
sett.: settimane
Vtg: vitellogenina

COMUNICAZIONE DEI DATI

Analisi statistica

52. Dato che il sesso genotipico è determinato per tutti i pesci oggetto della prova, i dati devono essere analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico (ossia maschi XY e femmine XX). Il mancato rispetto di tale condizione ridurrebbe notevolmente la potenza statistica dell'analisi. È preferibile effettuare le analisi statistiche secondo le procedure descritte nel documento dell'OCSE intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32). L'appendice 10 fornisce ulteriori orientamenti per l'analisi statistica.

53. Il disegno sperimentale e le prove statistiche prescelte devono avere una potenza tale da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint per i quali occorre determinare la NOEC (32). Le pertinenti concentrazioni con effetto e i parametri da riportare nella relazione possono dipendere dal quadro normativo. Occorre identificare per ciascun endpoint la variazione percentuale che è importante individuare o stimare. Il

disegno sperimentale deve essere concepito in modo da permettere ciò. Poiché è improbabile che la stessa variazione percentuale si verifichi in tutti gli endpoint e che si possa concepire un esperimento realizzabile che soddisfi i suddetti criteri per tutti gli endpoint, è necessario che il disegno sperimentale si concentri sugli endpoint che sono importanti per l'esperimento. L'appendice 10 contiene un diagramma di analisi statistica e orientamenti per facilitare il trattamento dei dati e la scelta del test o del modello statistico più adatti. È possibile impiegare altri approcci statistici, purché siano scientificamente giustificati.

54. È necessario analizzare le variazioni all'interno di ogni serie di repliche effettuando un'analisi della varianza o avvalendosi di tabelle di contingenza e utilizzare metodi sufficienti e adeguati di analisi statistica fondati su questa analisi. Per effettuare un confronto multiplo fra i risultati ottenuti alle singole concentrazioni e quelli ottenuti per i controlli, si raccomanda un test di tendenza regressivo (test di Jonckheere-Terpstra) nel caso delle risposte continue. Se i dati non sono compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona, devono essere utilizzati il test di Dunnett o il test di Dunn (se necessario, dopo un'adeguata trasformazione dei dati).
55. Per la fecondità il conteggio delle uova deve aver luogo ogni giorno, ma può essere analizzato nella sua globalità o come una misura ripetuta. L'appendice 10 precisa come va analizzato questo endpoint. Per i dati istopatologici espressi sotto forma di indici di gravità è stato messo a punto un nuovo test statistico, il Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. È necessario annotare nella relazione sulla prova qualsiasi endpoint osservato nei gruppi trattati con la sostanza chimica che presenti differenze significative rispetto a controlli adeguati.

Considerazioni relative all'analisi dei dati

Utilizzazione di livelli di esposizione compromessi

57. Diversi fattori vanno considerati al fine di stabilire se una replica o un intero trattamento presentano segni di tossicità evidente e devono pertanto essere esclusi dall'analisi. Si considera che esiste tossicità evidente in una replica fra 3 e 9 settimane dopo la fecondazione in presenza di una mortalità imputabile unicamente alla tossicità - e non ad errore tecnico - superiore a 4 individui. Altri sintomi di tossicità evidente comprendono emorragia, comportamenti anomali, movimenti natatori anomali, inappetenza, nonché qualunque altro segno clinico di malattia. Per individuare i segnali di tossicità subletale si rende a volte necessario ricorrere a valutazioni qualitative, sempre eseguite rispetto al gruppo di controllo con acqua di diluizione (solo acqua pulita). Se una tossicità evidente si

manifesta nel o nei trattamenti con la dose più elevata, si raccomanda di escludere dall'analisi tali trattamenti.

Gruppi di controllo con solvente

58. Il ricorso al solvente deve essere preso in considerazione soltanto come ultima istanza, dopo aver valutato tutte le altre opzioni di somministrazione della sostanza chimica. Se si utilizza un solvente, è necessario eseguire un controllo con acqua di diluizione in parallelo. Al completamento della prova, vanno valutati i potenziali effetti del solvente mediante un confronto statistico tra il gruppo di controllo con solvente e il gruppo di controllo con acqua di diluizione. I principali parametri da considerare in questo contesto sono gli indicatori di crescita (peso), poiché essi sono sensibili alla tossicità generale. Se tra il gruppo di controllo con acqua di diluizione e il gruppo di controllo con solvente vengono rilevate differenze statisticamente significative, si deve ricorrere al giudizio professionale di un esperto per stabilire se la validità della prova è compromessa. Se i due controlli presentano differenze, i gruppi esposti alla sostanza chimica devono essere confrontati con il controllo con solvente, a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il controllo con acqua di diluizione. Se non vi sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi di controllo, si raccomanda di confrontare i gruppi esposti alla sostanza chimica in esame con i due gruppi di controllo (solvente e acqua di diluizione) riuniti insieme, a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il solo gruppo di controllo con acqua di diluizione o con il solo gruppo di controllo con solvente.

Relazione sulla prova

59. I seguenti dati devono figurare nella relazione sulla prova:

Sostanza chimica in esame natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche;

- dati di identificazione chimica;

Sostanza monocostrituente:

- aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;
- identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, la purezza, l'identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).

Sostanza multicostrituente, UVCB e miscele:

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

Specie sperimentale:

- nome scientifico, ceppo, se disponibile, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

Condizioni sperimentali:

- fotoperiodo/i;
- disegno sperimentale (ad esempio, dimensioni della vasca, materiale e volume d'acqua, numero di vasche di prova e repliche, numero di larve per replica);
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);
- metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);
- efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati e rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;
- caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;
- concentrazioni nominali di prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard;
- qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, temperatura (giornaliera) e concentrazione di ossigeno disciolto;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati

- Dati comprovanti il fatto che i controlli hanno soddisfatto i criteri di validazione generali;
- dati relativi al gruppo di controllo (più controllo con solvente se del caso) e ai gruppi trattati: schiusa (tasso di schiusa e tempo di schiusa) per F1 e F2, sopravvivenza dopo la schiusa per F1, crescita (lunghezza e peso corporeo) per F1, sesso genotipico e differenziazione sessuale (ad esempio caratteri sessuali secondari basati sulle papille della pinna anale e istologia gonadica) per F1, sesso fenotipico per F1, caratteri sessuali secondari (papille della pinna anale) per F1, mRNA della *vgt* (o proteina VTG) per F1,

esame istopatologico (gonadi, fegato e reni) per F1 e riproduzione (fecondità e fertilità) per F0, F1; (cfr. le tabelle 1 e 2);

- approccio seguito per l'analisi statistica (analisi di regressione o analisi della varianza) e per il trattamento dei dati (test e modelli statistici utilizzati);
- concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta valutata;
- concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) per ogni risposta valutata ($p = 0,05$); EC_x per ogni risposta studiata, se del caso, e intervalli di confidenza (ad esempio 90 % o 95 %), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori tipo;
- eventuali deviazioni dal metodo di prova e dai criteri di accettazione e considerazioni relative alle potenziali conseguenze sui risultati della prova.

60. Per i risultati delle misurazioni degli endpoint vanno presentati i valori medi e le rispettive deviazioni standard (se possibile, per replica e per concentrazione).

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disruptors. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (12) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Available at: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- (20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (21) Capitolo C.15 del presente allegato, Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino.

- (22) Capitolo C.37 del presente allegato, Prova sui pesci di 21 giorni: Screening a breve termine dell'attività estrogenica e androgenica e dell'inibizione dell'aromatasi.
- (23) Capitolo C.41 del presente allegato, Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci.
- (24) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci.
- (25) Capitolo C.47 del presente allegato, Prova di tossicità sui pesci nei primi stadi di vita.
- (26) Capitolo C.49 del presente allegato, Prova di tossicità acuta sugli embrioni di pesci.
- (27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (31) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): prova di immunoassorbimento enzimatico.

Fecondità = numero di uova.

Fertilità = numero di uova vitali/fecondità.

Lunghezza alla forca (FL): lunghezza dall'apice del muso all'estremità dei raggi centrali della pinna caudale; è utilizzata per i pesci in cui è difficile determinare la fine della colonna vertebrale (www.fishbase.org).

Tasso di schiusa = larve/numero di embrioni caricati in un incubatore.

IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*): Comitato istituzionale per la cura e l'utilizzo degli animali.

Lunghezza standard (SL): lunghezza del pesce misurata tra l'apice del muso e l'estremità posteriore dell'ultima vertebra o l'estremità posteriore della parte laterale media della piastra ipurale. In altre parole, questa misurazione non tiene conto della lunghezza della pinna caudale. (www.fishbase.org).

Lunghezza totale (TL): lunghezza dall'apice del muso all'estremità del lobo più lungo della pinna caudale, generalmente misurata con i lobi appiattiti nel prolungamento della linea mediana. La misurazione si effettua in linea retta, senza seguire la curva del corpo (www.fishbase.org).

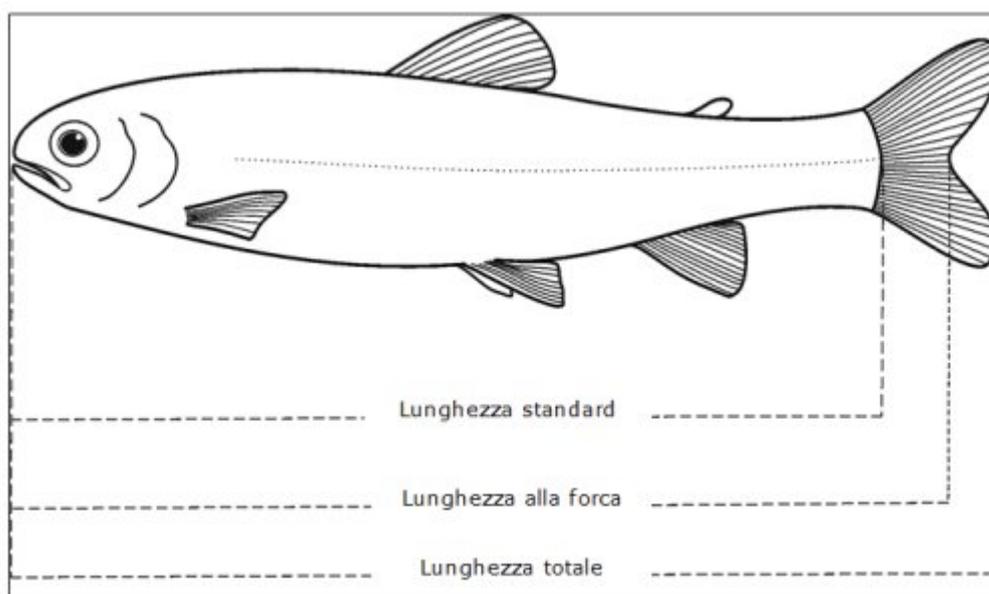


Figura 1: Descrizione delle varie lunghezze utilizzate

EC_x: (concentrazione con effetto dell'*x* %): la concentrazione che provoca un effetto nell'*x* % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC₅₀ è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni testate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

HPG (*Hypothalamic-pituitary-gonadal*) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.

IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*): Unione internazionale di chimica pura e applicata.

Tasso di carico: peso a umido dei pesci per volume di acqua.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): concentrazione più bassa testata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte, occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC). Le appendici 5 e 6 forniscono orientamenti al riguardo.

Concentrazione letale mediana (LC₅₀): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): notazione semplificata lineare delle molecole.

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua.

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

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

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare.

SDF: settimane dopo la fecondazione.

Appendice 2**ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE**

Sostanza	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	50 ng/l
Cloro organico totale	25 ng/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

Appendice 3**CONDIZIONI SPERIMENTALI PER IL MEOGRT**

1. Specie raccomandata	Medaka giapponese (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Tipo di prova	Flusso continuo
3. Temperatura dell'acqua	La temperatura nominale della prova è di 25 °C. La temperatura media in ogni vasca per tutta la durata della prova è di 24-26 °C.
4. Qualità dell'illuminazione	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro e ~150 lumen/m ²) (~150 lux).
5. Fotoperiodo	16 ore di luce, 8 ore di buio
6. Percentuale di caricamento	F0: 2 adulti/replica; F1: avvio con un massimo di 20 uova (embrioni)/replica, ridotti a 12 embrioni/replica alla schiusa poi 2 adulti (copia riproduttrice XX-XY) a 9-10 sdf per la fase di riproduzione
7. Volume utilizzabile minimo per vasca di prova	1,8 l (ad es., dimensioni di una vasca: 18x9x15 cm)
8. Rinnovo delle soluzioni di prova, in volume	Minimo di 5 rinnovi in volume/giorno fino a 16 rinnovi in volume/giorno (o flusso di 20 ml/min)
9. Età degli organismi sperimentali all'avvio della prova	F0: > 12 sdf preferibilmente senza superare 16 sdf
10. Numero di organismi per replica	F0: 2 pesci (coppia maschio e femmina); F1: massimo 20 pesci (uova)/replica (prodotti dalle coppie riproduttrici F0 e F1).
11. Numero di trattamenti	5 trattamenti per la sostanza chimica in esame più controlli appropriati
12. Numero di repliche per trattamento	Minimo 6 repliche per trattamento per la sostanza chimica in esame e minimo 12 repliche per il controllo, e per il controllo con solvente se utilizzato (il numero di repliche è raddoppiato durante la fase di riproduzione a F1)
13. Numero di organismi per prova	Minimo 84 pesci in F0 e 504 in F1. (in caso di controlli con solvente 108 pesci in F0 e 648 pesci in F1). L'unità di conteggio è il post-eleuteroembrione.
14. Regime alimentare	I pesci sono alimentati <i>ad libitum</i> con naupli di artemia di 24 ore (<i>Artemia</i> spp.), integrati, se necessario, da mangime in fiocchi disponibile in commercio (nell'appendice 6 figura un esempio di programma di alimentazione per garantire una crescita e uno sviluppo

- adeguati per una riproduzione sostenuta).
15. Aerazione Nessuna, salvo se l'ossigeno disciolto è <60 % del valore di saturazione dell'aria.
16. Acqua di diluizione Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita.
17. Periodo d'esposizione In linea di massima 19 settimane (da F0 alla schiusa di F2).
18. Endpoint biologici (principali) Tasso di schiusa (F1 e F2); sopravvivenza (F1, dalla schiusa a 4 sdf (fine stadio larvale/inizio stadio giovanile), da 4 a 9 (o 10) sdf (da inizio stadio giovanile a subadulti) e da 9 a 15 sdf (da subadulti a soppressione adulti); crescita (F1, lunghezza e peso a 9 e 15 sdf); caratteri sessuali secondari (F1, papille della pinna anale a 9 e 15 sdf); vitellogenina (F1, mRNA della *vtg* o proteina VTG a 15 sdf); sesso fenotipico (F1, tramite istologia delle gonadi a 15 sdf); riproduzione (F0 e F1, fecondità e fertilità per 21 giorni); tempo di deposizione (F1); e istopatologia (F1, gonadi, fegato e reni a 15 sdf).
19. Criteri di validità della prova Ossigeno disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione dell'aria; temperatura media dell'acqua di 24-26°C per tutta la durata della prova; riproduzione riuscita di ≥ 65 % delle femmine nei controlli; fecondità quotidiana media di ≥ 20 uova nei controlli; tasso di schiusa di ≥ 80 % (in media) nei controlli (in ciascuna delle generazioni F1 e F2); sopravvivenza dopo la schiusa fino a 3 sdf di ≥ 80 % (in media) e da 3 sdf fino alla soppressione per la generazione di ≥ 90 % (in media) nei controlli (F1), le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione devono essere mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi.

Appendice 4

ORIENTAMENTI SU VALORI DI CONTROLLO TIPICI

Va osservato che questi valori di controllo sono basati su un numero limitato di studi di validazione e possono essere soggetti a modifiche alla luce di ulteriori esperienze.

Crescita

Il peso e la lunghezza sono misurati per tutti i pesci prelevati per un campionamento a 9 (o 10) e 15 settimane dopo la fecondazione (sdf). Secondo questo protocollo il peso fresco atteso a 9 sdf è di 85-145 mg per i maschi e di 95-150 mg per le femmine. Il peso atteso a 15 sdf è di 250-330 mg per i maschi e di 280-350 mg per le femmine. Anche se per singoli pesci si possono riscontrare deviazioni significative da questi valori, un peso medio nei controlli che si discosta sostanzialmente da questi valori, e in particolare se è inferiore, indica problemi di alimentazione, di controllo della temperatura, di qualità dell'acqua o di malattia o una combinazione di diversi di questi fattori.

Schiusa

Il tasso di schiusa nei controlli è generalmente intorno al 90 %, tuttavia valori non superiori all'80 % non sono eccezionali. Un tasso di schiusa inferiore al 75 % può indicare un'agitazione insufficiente delle uova in fase di sviluppo o una cura insufficiente nella manipolazione delle uova, come un ritardo nella rimozione delle uova morte, con conseguente infezione micotica.

Sopravvivenza

I tassi di sopravvivenza fino a 3 sdf dalla schiusa e dopo 3 sdf sono generalmente del 90 % o superiori per i controlli, ma tassi di sopravvivenza non superiori all'80 % nei primi stadi di vita non sono allarmanti. Tassi di sopravvivenza nei controlli inferiori all'80 % sono preoccupanti e possono indicare una pulizia insufficiente delle vasche, con conseguente perdita di larve per malattia o asfissia dovuta agli scarsi livelli di ossigeno disciolto. La mortalità può anche risultare da ferite prodottesi durante la pulizia della vasca e dalla perdita di larve nel sistema di drenaggio della vasca.

Gene della vitellogenina

Se i livelli assoluti del gene della *vitellogenina* (*vtg*), espressi in numero di copie/ng dell'mRNA totale, possono variare notevolmente da un laboratorio all'altro a motivo delle procedure o della strumentazione utilizzate, il rapporto della *vtg* dovrebbe essere circa 200 volte più grande nelle femmine di controllo rispetto ai maschi di controllo. Non è raro che questo rapporto raggiunga valori compresi tra 1 000 e 2 000; rapporti inferiori a 200 sono invece sospetti e possono indicare problemi di contaminazione dei campioni o problemi legati alle procedure e/o ai reagenti utilizzati.

Caratteri sessuali secondari

Per i maschi il valore normale dei caratteri sessuali secondari, definiti come il numero totale di segmenti con papille nei raggi della pinna anale, è di 40-80 segmenti a 9-10 sdf. Entro le 15 sdf il valore per i maschi di controllo dovrebbe essere compreso tra 80 e 120 e pari a 0 per le femmine di controllo. Per motivi non conosciuti in casi rari alcuni maschi non presentano papille a 9 sdf, ma poiché tutti i maschi di controllo sviluppano papille entro 15 sdf, questo è probabilmente dovuto a un ritardo di sviluppo. La presenza di papille nelle femmine di controllo indica la presenza di maschi XX nella popolazione.

Maschi XX

L'incidenza normale dei maschi XX nei pesci di coltura sembra essere al massimo del 4 % a 25 C° e aumenta con l'aumentare della temperatura. È necessario prendere provvedimenti per ridurre al minimo la proporzione di maschi XX nella popolazione. Poiché l'incidenza di maschi XX sembra avere una componente genetica ed è pertanto ereditaria, un mezzo efficace per ridurre l'incidenza di maschi XX nella popolazione consiste nel monitorare lo stock coltivato e accertarsi che i maschi XX non siano utilizzati per la riproduzione.

Attività di riproduzione (deposizione di uova)

L'attività di riproduzione nelle repliche di controllo deve essere monitorata quotidianamente prima di effettuare la valutazione della fecondità. Si può valutare visivamente, dal punto di vista qualitativo, se le coppie di controllo depongono uova. Entro la 12-14 sdf la maggior parte delle coppie di controllo dovrebbe deporre uova. Uno scarso numero di coppie che depongono uova in questa fase indica problemi potenziali di salute, maturità o benessere dei pesci.

Fecondità

A 12-14 sdf femmine di medaka in buona salute e ben nutrite generalmente producono ogni giorno da 15 a 50 uova. La produzione di uova per 16 delle 24 coppie riproduttrici di controllo raccomandate (> 65 %) dovrebbe essere superiore a 20 uova per coppia al giorno e può arrivare fino a 40 uova al giorno. Una produzione inferiore può indicare problemi di maturità, malnutrizione o cattiva salute delle coppie riproduttrici.

Fertilità

La percentuale di uova fertili per le coppie riproduttrici di controllo è generalmente del 90 %, ma valori pari o superiori al 95 % non sono rari. Tassi di fertilità inferiori all'80% nelle uova di controllo sono sospetti e possono indicare individui in cattiva salute o condizioni di coltura non ottimali.

Appendice 5

ESEMPIO DI PROGRAMMA DI ALIMENTAZIONE

Nella tabella 1 figura un esempio di programma di alimentazione volto a garantire una crescita e uno sviluppo adeguati per una riproduzione sostenuta. Deviazioni da questo programma di alimentazione sono possibili, ma si raccomanda di testarle per verificare che la crescita e la riproduzione osservate siano accettabili. Per seguire il programma di alimentazione suggerito occorre, prima di cominciare la prova, determinare il peso secco dei naupli di artemia per volume di impasto liquido di naupli di artemia. Per far questo si pesa un volume definito di tale impasto, che è stato seccato per 24 ore a 60 °C in recipienti prepesati. Per tener conto del peso del sale nell'impasto liquido occorre seccare e pesare anche un volume identico della stessa soluzione salina utilizzata nell'impasto e sottrarre il peso del sale dal peso dell'impasto liquido di naupli di artemia. In alternativa i naupli di artemia possono essere filtrati e risciacquati con acqua distillata prima di essere seccati; si evita in questo modo la necessità di misurare il peso di un campione contenente unicamente sale. Queste informazioni permettono di convertire i dati della tabella 1 dal peso secco dei naupli di artemia al volume di impasto liquido di naupli di artemia da somministrare a ciascun pesce. Si raccomanda inoltre di pesare ogni settimana aliquote dell'impasto liquido di naupli di artemia per verificare che il peso secco somministrato sia corretto.

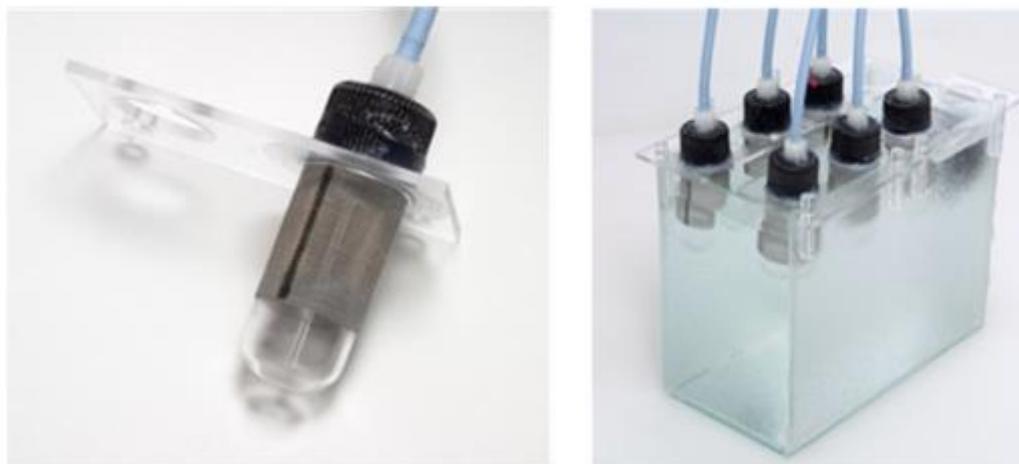
Tabella 1: Esempio di un programma di alimentazione

Giorni (dopo la schiusa)	Naupli di artemia (mg peso secco/pesce/giorno)
Giorno 1	0,5
Giorno 2	0,5
Giorno 3	0,6
Giorno 4	0,7
Giorno 5	0,8
Giorno 6	1,0
Giorno 7	1,3
Giorno 8	1,7
Giorno 9	2,2
Giorno 10	2,8
Giorno 11	3,5
Giorno 12	4,2
Giorno 13	4,5
Giorno 14	4,8
Giorno 15	5,2
Giorni 16-21	5,6
Settimana 4	7,7
Settimana 5	9,0
Settimana 6	11,0
Settimana 7	13,5
Settimana 8 - soppressione	22,5

Appendice 6

ESEMPI DI UN INCUBATORE DI UOVA

Esempio A



Questo incubatore consiste in un tubo da centrifuga in vetro munito di una sezione trasversale, collegato da un manicotto in acciaio inossidabile e mantenuto in posizione da un tappo a vite per centrifuga. Un tubicino in vetro o in acciaio inossidabile che passa attraverso il tappo ed è posizionato vicino al fondo arrotondato dell'incubatore ha la funzione di diffondere delicatamente le bolle d'aria per mettere le uova in sospensione e di ridurre la trasmissione di infezioni micotiche da parte di organismi saprofiti tra le uova, facilitando al tempo stesso gli scambi chimici tra l'incubatore e la vasca in cui è posto.

Esempio B



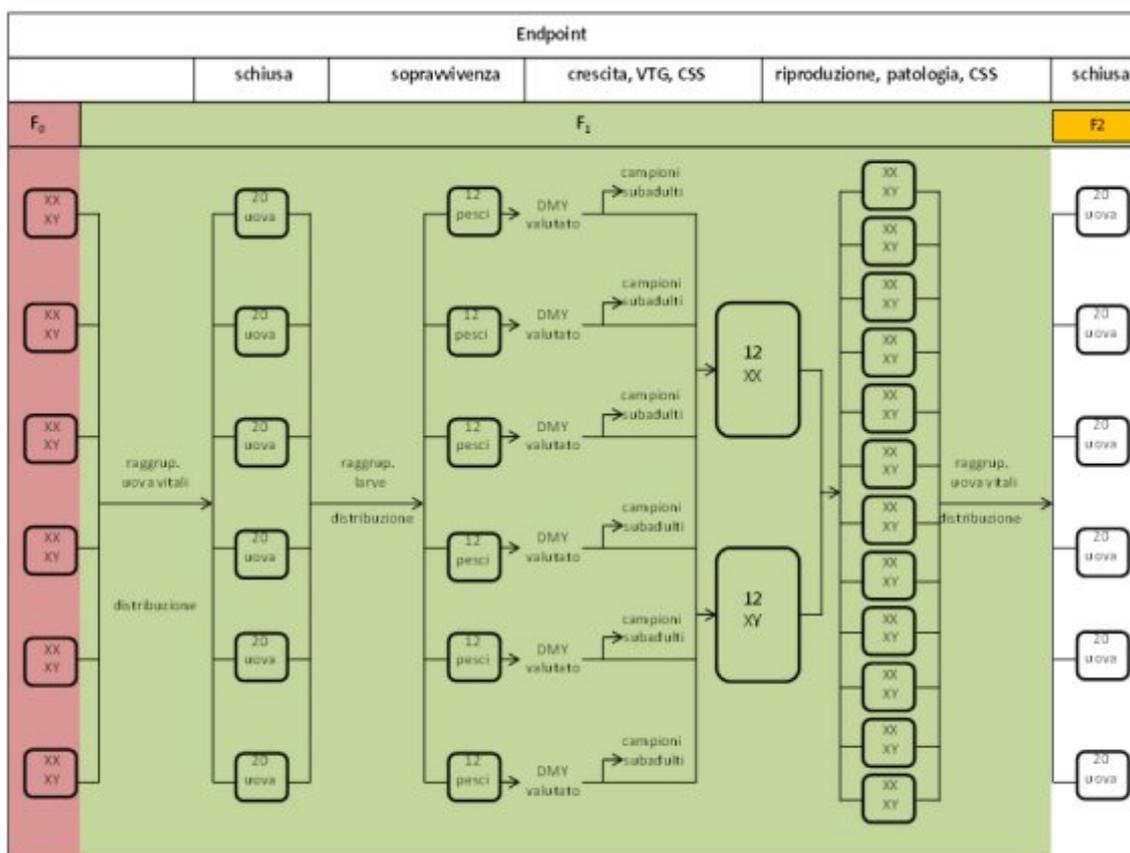
Questo incubatore è costituito da un corpo cilindrico in vetro (5 cm di diametro e 10 cm di

altezza) e da una rete metallica inossidabile (0.25 ϕ e 32 maglie) fissata al fondo del corpo cilindrico da un anello in PTFE. Gli incubatori sono sospesi a una barra a movimento verticale posizionata sopra le vasche e agitati verticalmente (con un movimento di circa 5 cm di ampiezza) secondo un ciclo appropriato per le uova di medaka (ogni 4 secondi circa).

Appendice 7

DIAGRAMMA SCHEMATICO DEL RAGGRUPPAMENTO E DELLA RIPARTIZIONE DELLE REPLICHE SECONDO IL METODO DI PROVA MEOGRT

Figura 1: Raggruppamento e ripartizione delle repliche dall'inizio alla fine della prova MEOGRT. La figura rappresenta un trattamento o la metà di un gruppo di controllo. A motivo del raggruppamento l'identità delle repliche non è continua per tutta la durata della prova. Si noti che il termine "uova" si riferisce a uova vitali e fecondate (equivale a embrioni).



Trattamenti e replica

Il metodo di prova raccomanda cinque trattamenti con la sostanza chimica in esame utilizzando materiale di grado tecnico e un controllo negativo. Il numero di repliche per trattamento non rimane costante per tutta la durata della prova MEOGRT e il numero di repliche nel controllo trattato è doppio rispetto a ciascun trattamento con la sostanza chimica in esame. Nella F₀ ogni trattamento con la sostanza chimica in esame prevede sei repliche, mentre il controllo negativo trattato prevede 12 repliche. I solventi sono vivamente sconsigliati; qualora sia utilizzato un solvente, è necessario inserire nella relazione sul MEOGRT la giustificazione per l'utilizzo del solvente e per la sua scelta. Inoltre se è utilizzato un solvente sono necessari due tipi di controlli: a) un controllo con il solvente e b)

un controllo negativo. Ciascuno di questi due gruppi di controllo deve comportare una serie completa di repliche in tutte le fasi di svolgimento della prova MEOGRT. Questa struttura di repliche resta inalterata per tutto lo sviluppo dell'organismo sperimentale nella generazione F1 (e nella generazione F2 fino alla schiusa). Tuttavia nello stadio adulto, quando le coppie riproduttrici di F1 sono formate, il numero di repliche di coppie riproduttrici per trattamento è raddoppiato per un risultato ottimale; vi sono pertanto fino a 12 coppie di repliche in ciascun trattamento con la sostanza chimica in esame e 24 coppie di repliche nel gruppo di controllo (e altre 24 coppie di repliche nel controllo con il solvente, se necessario). La determinazione della schiusa delle uova deposte dalle coppie F1 è effettuata sulla stessa struttura di repliche utilizzata per le uova deposte dalle coppie F0, ossia inizialmente sei repliche per trattamento con la sostanza chimica in esame e 12 repliche nel o nei gruppi di controllo.

Appendice 8

CONTEGGIO DELLE PAPILLE DELLA PINNA ANALE

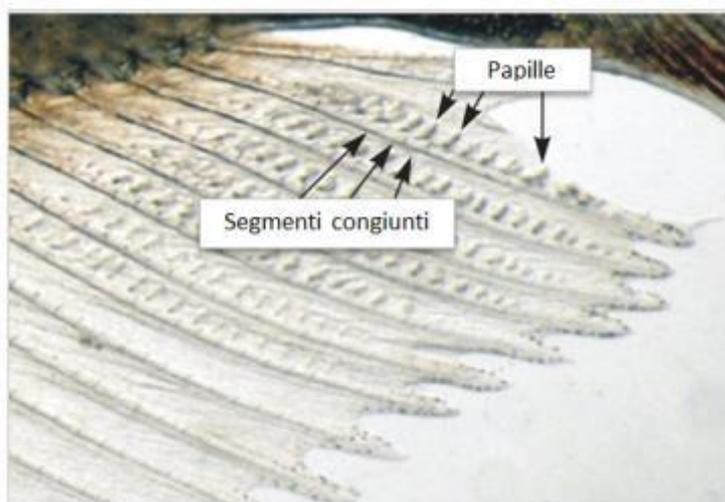
MATERIALI E REAGENTI PRINCIPALI

- Microscopio a dissezione (con macchina fotografica facoltativa)
- Fissativo (ad es., di Davidson (quello di Bouin è sconsigliato), se il conteggio non è effettuato a partire dall'analisi dell'immagine)

Procedura

Dopo la necropsia occorre ottenere un'immagine della pinna anale per poter agevolmente contare le papille della pinna anale. Anche se si consiglia di utilizzare l'immagine, è possibile fissare la pinna anale con fissativo di Davidson o con un altro fissativo adeguato per 1 minuto circa. È importante tenere la pinna anale piatta durante la fissazione per facilitare il conteggio delle papille. La carcassa con la pinna anale può essere conservata nel fissativo di Davidson o in un altro fissativo adeguato fino al momento dell'analisi. Contare il numero di segmenti congiunti (si veda la **figura 1**) con papille che sporgono dal margine posteriore del segmento congiunto.

Figura 1: Papille della pinna anale



Appendice 9

CRONOLOGIA DETTAGLIATA DELLA PROVA MEOGRT

Settimane di prova 1-3 (F0)

I pesci riproduttori della generazione F0 che hanno soddisfatto i criteri di selezione (cfr. i paragrafi 16-20) sono esposti per tre settimane per consentire ai gameti e ai tessuti gonadici in sviluppo di essere esposti alla sostanza chimica in esame. Ogni vasca di replica contiene una sola coppia riproduttrice (coppia femmina XX-maschio XY). Le uova deposte sono raccolte e contate e la loro fertilità è valutata per 21 giorni consecutivi, cominciando dal 1° giorno di prova.

Settimana di prova 4 (F0 e F1)

È preferibile che le uova fecondate e vitali (embrioni) siano raccolte in un solo giorno; tuttavia, se non vi sono embrioni a sufficienza, essi possono essere raccolti su un arco di due giorni. Se raccolti in due giorni, tutti gli embrioni dello stesso trattamento raccolti il primo giorno sono raggruppati con quelli raccolti il secondo giorno. Quindi la totalità degli embrioni di ciascun trattamento così raggruppati è distribuita in modo casuale negli incubatori di replica in proporzione di 20 embrioni per incubatore. La mortalità delle uova fecondate (embrioni) è controllata e registrata quotidianamente. Le uova morte sono rimosse dagli incubatori (la morte di uova fecondate può essere denotata, soprattutto nei primi stadi, da marcata perdita di traslucidità e cambiamento di colorazione dovute a coagulazione e/o precipitazione delle proteine, con conseguente aspetto bianco opaco; OCSE (2010).

Nota: Se un solo trattamento necessita di un secondo giorno di raccolta, tutti i trattamenti (compresi i controlli) devono seguire la stessa procedura. Se dopo il secondo giorno di raccolta il numero di embrioni nell'ambito di un trattamento è insufficiente per poter caricare 20 embrioni per incubatore, ridurre a 15 il numero di embrioni per incubatore caricati per questo trattamento specifico. Se gli embrioni non sono sufficienti per caricarne 15 per incubatore, ridurre il numero di incubatori di replica fino a un numero che permetta di caricare 15 embrioni per incubatore. Inoltre nella F0 si possono aumentare le coppie riproduttrici per trattamento e per i controlli in modo da produrre più uova e raggiungere il numero consigliato di 20 per replica.

Nel 24° giorno di prova le coppie riproduttrici della F0 sono soppresse con metodi non cruenti e il loro peso e lunghezza sono registrati. Se necessario, è possibile mantenere in vita per 1-2 giorni in più le coppie riproduttrici della F0 per avviare la generazione F1.

Settimane di prova 5-6 (F1)

Uno o due giorni prima dell'inizio previsto della schiusa fermare o ridurre l'agitazione delle uova in incubazione per accelerare la schiusa. Poiché ogni giorno si schiudono alcuni embrioni, le larve sono raggruppate per trattamento e distribuite sistematicamente nelle

vasche di replica loro destinate nell'ambito di un trattamento specifico; ogni vasca non può contenere più di 12 larve. Tale ripartizione è effettuata casualmente; le larve sono selezionate e poste una per una in repliche successive in modo casuale passando in ordine da una replica del trattamento considerato alla successiva fino a quando tutte le repliche nel trattamento comportano 12 larve. Se non vi sono larve a sufficienza per riempire tutte le repliche, fare in modo che quante più repliche possibili contengano 12 larve per avviare la fase F1.

Le uova che non si sono schiuse entro il doppio del giorno mediano di schiusa nei controlli sono considerate non vitali e scartate. Il numero di larve è registrato e il tasso di schiusa è calcolato in ciascuna replica.

Settimane di prova 7-11 (F1)

La sopravvivenza delle larve è controllata e registrata quotidianamente in tutte le repliche. Il 43° giorno di prova il numero di pesci sopravvissuti in ogni replica è registrato insieme al numero iniziale di larve poste nella replica (valore nominale: dodici). Questo permette di calcolare la percentuale di sopravvivenza dalla schiusa allo stadio subadulto.

Settimana di prova 12 (F1)

Nel 78°-85° giorno di prova si procede a un piccolo prelievo tissutale dalla pinna caudale di ogni pesce per determinare il sesso genotipico dell'individuo. Questa informazione è utilizzata per formare le coppie riproduttrici.

Entro tre giorni dalla determinazione del sesso genotipico di ogni pesce sono formate casualmente 12 coppie riproduttrici per trattamento e 24 coppie per controllo. Due pesci XX e XY da ciascuna replica sono selezionati casualmente, raggruppati per sesso e poi selezionati in modo casuale per formare una coppia riproduttrice (ossia una coppia XX-XY). Si procede a formare un minimo di 12 repliche per trattamento con la sostanza chimica e un minimo di 24 repliche per il controllo, con una coppia riproduttrice per replica. Se una replica non dispone di due pesci XX o due pesci XY che possono essere raggruppati, occorre procurarsi pesci del sesso genotipico richiesto da altre repliche nello stesso trattamento.

I pesci rimasti (massimo 8 pesci per replica) sono soppressi con metodi non cruenti e sottoposti a campionamento per i vari endpoint subadulti. I dati relativi al gene *dmy* (XX o XY) per tutti i campioni subadulti sono conservati in modo che sia possibile correlare tutti i dati relativi agli endpoint al sesso genetico di ciascun individuo.

Settimane di prova 13-14 (F1)

L'esposizione continua durante il passaggio delle coppie riproduttrici subadulte allo stadio adulto. Il 98° giorno di prova (ossia il giorno che precede l'inizio della raccolta delle uova) le uova sono prelevate dalle vasche e dalle femmine.

Settimane di prova 15-17 (F1)

Le uova deposte sono raccolte quotidianamente per 21 giorni consecutivi in ogni replica e la loro fecondità e fertilità sono valutate.

Settimana di prova 18 (ripetizione della settimana di prova 4) (F1 e F2)

Il 120° giorno di prova si procede la mattina alla raccolta delle uova in ogni vasca di replica. Le uova raccolte sono valutate e le uova fecondate (private dei filamenti) di ogni coppia riproduttrice sono raggruppate per trattamento e distribuite sistematicamente negli incubatori in proporzione di 20 uova fecondate per incubatore. Gli incubatori possono essere posti in "vasche per incubatori" separate per ogni trattamento o nella vasca di replica che, dopo la schiusa, conterrà le larve schiuse. È preferibile che gli embrioni siano raccolti in un solo giorno; tuttavia, se non vi sono embrioni a sufficienza, essi possono essere raccolti su un arco di due giorni. Se raccolti in due giorni, tutti gli embrioni dello stesso trattamento raccolti il primo giorno sono raggruppati con quelli raccolti il secondo giorno. Quindi la totalità degli embrioni di ciascun trattamento così raggruppati è distribuita in modo casuale negli incubatori di replica in proporzione di 20 embrioni per incubatore. Nota: se un solo trattamento necessita di un secondo giorno di raccolta, tutti i trattamenti (compresi i controlli) devono seguire la stessa procedura. Se dopo il secondo giorno di raccolta il numero di embrioni in un determinato trattamento è insufficiente per poter caricare 20 embrioni per incubatore, ridurre a 15 il numero di embrioni per incubatore per questo trattamento specifico. Se gli embrioni non sono sufficienti per caricarne 15 per incubatore, ridurre il numero di incubatori di replica fino a un numero che permetta di caricare 15 embrioni per incubatore.

Il 121° giorno di prova (o il 122° se è necessario un giorno supplementare per accertarsi che la F2 sia stata ben avviata) le coppie riproduttrici della F1 sono soppresse con metodi non cruenti e analizzate per misurare gli endpoint adulti. Se necessario, si possono mantenere in vita per 1-2 giorni in più le coppie riproduttrici della F1 per avviare la generazione F2.

Settimane di prova 19-20 (F2)

Uno o due giorni prima dell'inizio previsto della schiusa fermare o ridurre l'agitazione delle uova in incubazione per accelerare la schiusa. Se la prova termina con la schiusa della F2, ogni giorno le larve sono contate e scartate. (Gli embrioni che non si sono schiusi dopo un periodo di incubazione prolungato, definito come il doppio del giorno mediano di schiusa nei controlli, sono considerati non vitali).

Appendice 10

ANALISI STATISTICA

I tipi di dati biologici generati con la prova MEOGRT non sono specifici di questa prova e, salvo per i dati di patologia, sono stati messi a punto numerosi metodi statistici che consentono di analizzare correttamente dati analoghi sulla base delle loro caratteristiche, in particolare normalità e omogeneità della varianza, e sulla base del fatto che lo studio si presti alla verifica di ipotesi o all'analisi di regressione, a test parametrici o non parametrici, ecc. In linea generale, le analisi statistiche consigliate sono conformi alle raccomandazioni dell'OCSE sui dati di ecotossicità (OCSE 2006); la figura 2 illustra un diagramma decisionale per l'analisi dei dati della prova MEOGRT.

Si presuppone che gli insiemi di dati forniscano per lo più risposte monotone. Occorre inoltre considerare se utilizzare un test statistico unilaterale o bilaterale. Si consiglia di utilizzare test unilaterali, a meno che per motivi biologici questa soluzione non sia appropriata. La sezione che segue raccomanda test statistici specifici, ma se metodi statistici più appropriati e/o più potenti sono messi a punto per essere applicati ai dati specifici generati con la prova MEOGRT, è opportuno utilizzarli per beneficiare di tali vantaggi.

I dati della prova MEOGRT devono essere analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico. Esistono due strategie per analizzare i dati relativi ai pesci che presentano un'inversione sessuale (maschi XX o femmine XY): 1) escludere dalla prova tutti i dati relativi ai pesci che presentano un'inversione sessuale, salvo per quanto riguarda la prevalenza dell'inversione sessuale in ciascuna replica; 2) lasciare i dati relativi ai pesci che presentano un'inversione sessuale ed effettuare un'analisi sulla base del genotipo.

Dati istopatologici

I dati istopatologici sono comunicati sotto forma di indici di gravità, che sono valutati utilizzando una procedura statistica di recente elaborazione, la Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). La correzione di tipo *Rao-Scott* permette di tenere conto delle repliche; la procedura RSCABS *by Slices* (per tranches) tiene conto dell'aspettativa biologica secondo la quale gli indici di gravità tendono ad aumentare con l'aumento delle concentrazioni di trattamento. Per ciascuna diagnosi i risultati dell'RSCAB indicano quali trattamenti comportano una prevalenza di patologia superiore rispetto ai controlli e il livello di gravità corrispondente.

Dati relativi alla fecondità

I dati di fecondità sono analizzati mediante il test di tendenza regressivo di Jonckheere-Terpstra o di Williams per determinare gli effetti del trattamento, purché i dati siano compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona. Con un test regressivo i confronti sono effettuati con un livello di significatività dello 0,05 e senza correzione per il numero di confronti effettuati. I dati dovrebbero essere compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona, ma questo aspetto può essere verificato mediante

un'ispezione visiva dei dati o costruendo i contrasti lineari e quadratici delle medie per trattamento dopo una gerarchizzazione dei dati. Tranne qualora il contrasto quadratico sia significativo e il contrasto lineare non lo sia, si effettua il test di tendenza. Altrimenti si utilizza il test di Dunnett per determinare gli effetti del trattamento se i dati presentano una distribuzione normale e varianze omogenee. Se tali condizioni non sono soddisfatte, si utilizza il test di Dunn con correzione di Bonferroni-Holm. Tutti i test indicati sono realizzati indipendentemente da un test globale F o di Kruskal-Wallis. Ulteriori precisazioni sono riportate nell'OCSE 2006.

Possono essere utilizzati metodi alternativi, come un modello lineare generalizzato con errori di Poisson per il conteggio delle uova (senza trasformazione), se giustificato dal punto di vista statistico (Cameron e Trividi, 2013). Se si utilizza un approccio alternativo si consiglia di ricorrere a uno specialista di statistica.

Conteggio quotidiano delle uova su una sola generazione

Il modello ANOVA è dato da $Y = \text{Tempo} + \text{Trattamento} + \text{Tempo} * \text{Trattamento} + \text{Generazione} * \text{Trattamento} + \text{Tempo} * \text{Replica}(\text{Trattamento})$, con effetti casuali di replica(Generazione*Trattamento) e Tempo*Replica(Trattamento), consentendo componenti di varianza diseguali per entrambi i tipi su più generazioni. In questo contesto "Tempo" si riferisce alla frequenza del conteggio delle uova (ad es. giorno o settimana). Si tratta di un'analisi su misure ripetute: le correlazioni tra osservazioni sulle stesse repliche rendono conto della natura dei dati in quanto misure ripetute.

I principali effetti del trattamento sono sottoposti al test di Dunnett (o di Dunnett-Hsu), che permette di correggere il numero di confronti. Queste correzioni sono necessarie per l'effetto principale di generazione o tempo in quanto questi due fattori non sono associati a un livello di "controllo" e ogni coppia di livelli rappresenta un confronto di potenziale interesse. Nei due casi, se il test F per l'effetto principale è significativo al livello 0,05, i confronti tra coppie di diversi livelli di tale fattore possono essere testati al livello 0,05 senza ulteriori correzioni.

Il modello comprende interazioni a due e tre fattori, così che un effetto principale per, ad esempio, il tempo può non essere significativo anche se il tempo ha un impatto significativo sui risultati. Quindi, se un'interazione a due o tre fattori comprendente il tempo è significativa al livello 0,05, si possono accettare i confronti dei livelli di tempo al livello di significatività 0,05 senza ulteriori correzioni.

Seguono i test F per la significatività del trattamento nel tempo, ossia le *tranche* (*slices*) nella tabella ANOVA. Se, ad esempio, la *tranche* corrispondente al trattamento applicato alla generazione F1 e al tempo 12 è significativa al livello 0,05, allora i confronti tra coppie per il trattamento applicato alla generazione F1 e al tempo 12 possono essere accettati al livello 0,05 senza ulteriori correzioni. Norme analoghe si applicano ai test relativi al tempo nella generazione F1 in un trattamento e alla generazione associata a un tempo e un trattamento dati.

Infine per i confronti che non rientrano in nessuna delle categorie di cui sopra, i confronti devono essere corretti utilizzando la correzione dei valori p secondo Bonferroni-Holm. Maggiori informazioni sulle analisi di tali modelli si trovano in Hocking (1985) e Hochberg e Tamhane (1987).

In alternativa i dati grezzi sono registrati e presentati nella relazione sullo studio come la fecondità (numero di uova) per replica per ogni giorno. Si deve calcolare la media dei dati grezzi per replica e applicare una trasformazione in radice quadrata. Un'ANOVA a un fattore deve essere calcolata sulle medie trasformate per replica, seguita dai contrasti di Dunnett. Può essere utile anche esaminare visivamente i dati di fecondità di ciascun trattamento e/o replica con un grafico a dispersione che rappresenta la distribuzione dei dati nel tempo. Questo metodo consentirà una valutazione informale degli effetti potenziali nel tempo.

Analisi di tutti gli altri dati biologici

Le analisi statistiche sono fondate sull'ipotesi che se le dosi sono correttamente selezionate i dati saranno monotoni. Si presume pertanto che i dati siano monotoni e la loro monotonicità è formalmente valutata mediante contrasti lineari e quadratici. Se i dati sono monotoni, si raccomanda di procedere a un test di tendenza di Jonckheere-Terpstra sulle medie delle repliche (come consigliato nell'OCSE 2006). Se il contrasto quadratico è significativo e il contrasto lineare non lo è, i dati sono considerati non monotoni.

Se i dati sono non monotoni, in particolare a causa della risposta ridotta del trattamento più elevato o dei due trattamenti più elevati, occorre valutare l'opportunità di escludere l'insieme di dati e di procedere all'analisi senza questi trattamenti. Tale decisione necessiterà del parere di un esperto e dovrà essere fondata su tutti i dati disponibili, in particolare quelli che indicano una tossicità manifesta a questi livelli di trattamento.

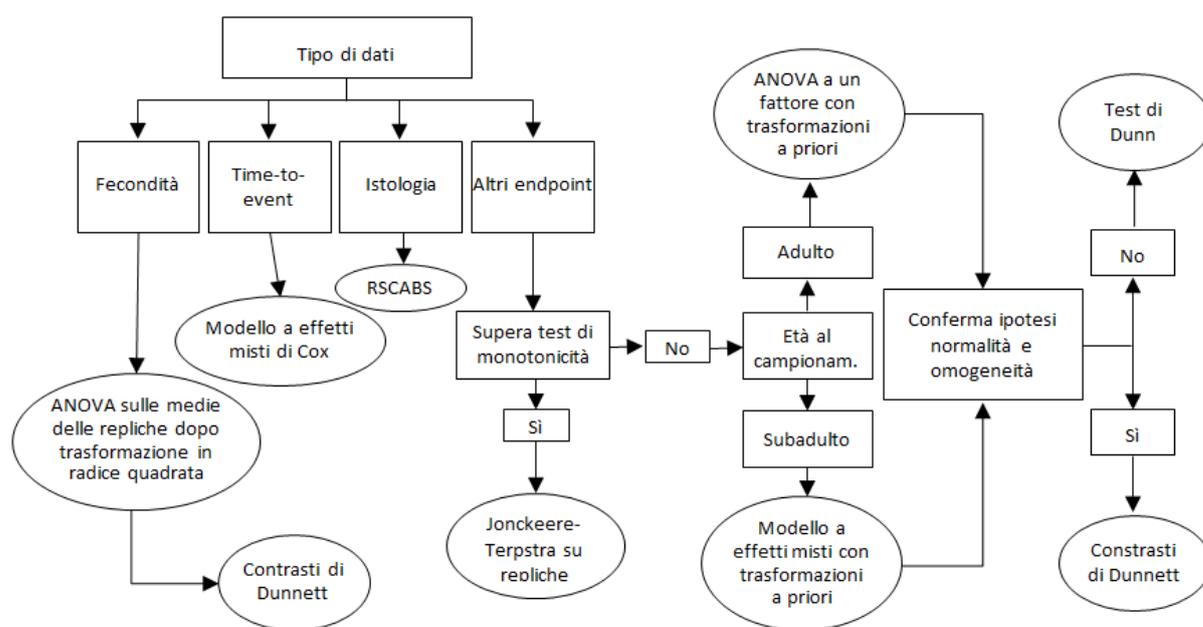
Per il peso e la lunghezza non si consiglia di trasformare i dati, anche se a volte questo può risultare necessario. Una trasformazione logaritmica è invece consigliata per i dati relativi alla vitellogenina; una trasformazione in radice quadrata è consigliata per i dati CSS (papille della pinna anale); una trasformazione in radice quadrata dell'arcoseno è consigliata per i dati relativi al tasso di schiusa, alla percentuale di sopravvivenza, al rapporto numerico tra i sessi e alla percentuale di uova fertili. Il tempo fino alla schiusa e il tempo fino alla prima deposizione sono trattati come dati di tipo "time-to-event" e gli embrioni che non si schiudono nel periodo stabilito o le repliche che non depongono sono trattati come dati censurati a destra. Il tempo fino alla schiusa è calcolato a partire dal giorno mediano di schiusa di ogni replica. Questi endpoint sono analizzati utilizzando un modello a effetti misti a rischi proporzionati di Cox.

I dati biologici relativi ai campioni di adulti sono misurati una volta per replica, ossia vi è un pesce XX e un pesce XY per vasca di replica. Si raccomanda pertanto di procedere a un'ANOVA a un fattore sulle medie delle repliche. Se le ipotesi dell'ANOVA (normalità e omogeneità della varianza) sono valutate sui residui dell'ANOVA mediante, rispettivamente, test di Shapiro-Wilks e test di Levene) sono confermate, i contrasti di Dunnett devono

essere utilizzati per determinare i trattamenti che differivano dal controllo. D'altro canto, se le ipotesi dell'ANOVA non sono confermate, occorre procedere a un test di Dunn per determinare quali trattamenti differivano dal controllo. Si raccomanda una procedura analoga per i dati sotto forma di percentuali (fertilità, schiusa e sopravvivenza).

I dati biologici ricavati dai campioni subadulti comportano da 1 a 8 misurazioni per replica, il che significa che si può avere un numero variabile di individui che contribuiscono alla media delle repliche per ogni sesso genotipico. Si consiglia pertanto di utilizzare un modello ANOVA a effetti misti seguito dai contrasti di Dunnett se le ipotesi di normalità e omogeneità della varianza sono confermate (sui residui dell'ANOVA a effetti misti). Se le ipotesi non sono state confermate, occorre procedere a un test di Dunn per determinare quali trattamenti differivano dal controllo.

Figura 2: Diagramma decisionale delle procedure statistiche raccomandate per l'analisi dei dati della prova MEOGRT.



Bibliografia

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

- (3) Hocking RR (1985). *The Analysis of Linear Models*, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). *Multiple Comparison Procedures*. John Wiley and Sons, New York.

C.53 METODO DI PROVA SULLA CRESCITA E LO SVILUPPO DELLE LARVE DI ANFIBIO (LAGDA)

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 241 (2015). La necessità di sviluppare e validare un protocollo sperimentale in grado di individuare e di caratterizzare le conseguenze dannose dell'esposizione a sostanze chimiche tossiche negli anfibi deriva dai timori che il livello attuale delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente sia tale da indurre effetti nocivi sull'uomo e sulla fauna selvatica. La linea guida dell'OCSE per il saggio sulla crescita e lo sviluppo delle larve di anfibio (*Larval Amphibian Growth and Development Assay - LAGDA*) descrive prove di tossicità condotte su una specie di anfibi che considerano la crescita e lo sviluppo dalla fecondazione fino all'inizio dello stadio giovanile, valutando (nel corso di 16 settimane, in genere) lo sviluppo iniziale, la metamorfosi, la sopravvivenza, la crescita e la maturazione parziale del sistema riproduttivo. Esso consente inoltre di misurare una serie di altri endpoint in vista della valutazione diagnostica di sostanze chimiche sospettate di essere interferenti endocrini o di altri tipi di sostanze con effetti tossici sullo sviluppo e sulla riproduzione. Il metodo descritto nel presente metodo di prova si ispira ai lavori di validazione condotti sulla rana della specie *Xenopus laevis* (Xenopo liscio o rana artigliata africana) da parte dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (U.S. EPA), con il sostegno del Giappone (1). Altre specie di anfibi possano essere utilizzate nelle prove sulla crescita e lo sviluppo intese a determinare se il sesso genetico sia una componente importante, tuttavia i metodi specifici e gli endpoint di osservazione dettagliati nel presente metodo di prova si applicano esclusivamente a *Xenopus laevis*.
2. Il LAGDA funge da prova di livello superiore sugli anfibi intesa a raccogliere informazioni più complete sulle relazioni concentrazione-risposta che inducono effetti nocivi; informazioni che possono essere successivamente utilizzate per identificare e caratterizzare i pericoli e per valutare il rischio ecologico. Il metodo di prova si colloca al livello 4 del Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze che alterano il sistema endocrino; in tale contesto, le prove *in vivo* forniscono inoltre dati relativi agli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino (2). Il progetto sperimentale generale comporta l'esposizione di embrioni di *X. laevis* allo stadio di sviluppo 8-10 secondo Nieuwkoop e Faber (NF) (3) a un minimo di quattro diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame (distanziate generalmente a intervalli definiti secondo una progressione semi-logaritmica) e uno o più controlli fino a 10 settimane dopo il tempo mediano trascorso fino allo stadio NF62 nel controllo, con un sottocampione intermedio allo stadio NF62 (≤ 45 giorni dopo la fecondazione; di norma circa 45 giorni (dpf)). Per ciascuna concentrazione di prova sono testate quattro repliche, con otto repliche per il

controllo. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione (nel sottocampione intermedio e nel campione finale al completamento della prova) includono gli indicatori di tossicità generalizzata: la mortalità, il comportamento anomalo e gli indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli endpoint intesi a caratterizzare i meccanismi di azione della tossicità che colpiscono i processi fisiologici mediati dagli estrogeni, dagli androgeni o dalla tiroide. Il metodo mira in via prioritaria ad evidenziare i potenziali effetti sulla popolazione (vale a dire gli effetti negativi su sopravvivenza, sviluppo, crescita e sviluppo riproduttivo) al fine di calcolare la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) o la concentrazione che induce una variazione dell' x % (EC_x) nell'endpoint misurato. Giova notare che gli approcci di tipo EC_x sono raramente adatti per ampi studi di questo tipo, in cui l'aumento del numero di concentrazioni di prova per determinare l' EC_x desiderato può risultare impraticabile. Inoltre, il metodo non si applica alla fase di riproduzione propriamente detta. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. A motivo del numero limitato di sostanze chimiche testate e di laboratori coinvolti nella validazione di questo metodo di prova piuttosto complesso (in particolare la riproducibilità inter-laboratori non è finora documentata da dati sperimentali), si può prevedere che la linea guida n. 241 dell'OCSE sarà rivista e, se necessario, aggiornata quando sarà disponibile un numero sufficiente di studi per verificare l'impatto di questo nuovo disegno sperimentale. Il LAGDA è un importante protocollo sperimentale che permette di studiare i potenziali fattori che contribuiscono al declino della popolazione di anfibi valutando gli effetti dell'esposizione alle sostanze chimiche durante il delicato stadio larvale, in cui gli effetti sulla sopravvivenza e sullo sviluppo, compreso lo sviluppo normale degli organi riproduttivi, possono avere ripercussioni negative sulle popolazioni.
4. La prova è intesa a individuare gli effetti apicali risultanti dai meccanismi endocrini e non endocrini e comprende gli endpoint diagnostici che sono, in parte, specifici dei principali meccanismi di azione endocrini. Si noti che prima dell'elaborazione del LAGDA non esisteva alcuna prova validata che considerasse questa funzione per gli anfibi.
5. Prima di iniziare la conduzione della prova, è importante disporre di informazioni sulle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, in particolare per poter produrre soluzioni chimiche stabili. È inoltre necessario disporre di un metodo analitico sufficientemente sensibile per verificare le concentrazioni della sostanza chimica in esame. Per una durata di circa 16 settimane, il protocollo necessita in totale di 480 animali, cioè embrioni di *X. laevis* (o di 640 embrioni se si utilizza un controllo con solvente) per

garantire che la prova sia sufficientemente potente per valutare gli endpoint osservati a livello della popolazione, quali la crescita, lo sviluppo e la maturazione riproduttiva.

6. Prima di utilizzare il metodo di prova per testare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se esso genererà risultati accettabili nel quadro regolamentare previsto. Inoltre, il presente metodo di prova non valuta direttamente la fecondità e quindi può non essere applicabile ad una fase più avanzata del livello 4 del quadro concettuale dell'OCSE.

FONDAMENTO SCIENTIFICO DEL METODO DI PROVA

7. Gran parte delle conoscenze di cui disponiamo in materia di biologia degli anfibi è stata ottenuta utilizzando la specie di laboratorio *X. laevis*. Questa specie può essere generalmente allevata in laboratorio; l'ovulazione può essere indotta mediante gonadotropina corionica umana (hCG) e gli stock di animali sono facilmente disponibili presso fornitori commerciali.
8. Come tutti i vertebrati, la riproduzione degli anfibi è controllata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (asse HPG) (4). Gli estrogeni e gli androgeni sono mediatori di questo sistema endocrino: controllano lo sviluppo e la fisiologia dei tessuti sessualmente dimorfici. Il ciclo di vita degli anfibi comporta tre distinte fasi in cui l'asse è particolarmente attivo: 1) la differenziazione delle gonadi durante lo sviluppo larvale; 2) lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie e la maturazione delle gonadi nella fase giovanile; e 3) la riproduzione funzionale degli adulti. In ciascuna di queste tre fasi di sviluppo il sistema endocrino può potenzialmente essere alterato da alcune sostanze chimiche, quali gli estrogeni e gli androgeni, con la conseguenza di perdita di capacità riproduttiva degli organismi.
9. Le gonadi iniziano lo sviluppo nello stadio NF43, quando inizia a formarsi la cresta genitale bipotenziale. La differenziazione delle gonadi inizia a partire dallo stadio NF52, quando le cellule germinali primordiali migrano verso il tessuto medullare (maschi) o rimangono nella regione corticale (femmine) delle gonadi in sviluppo (3). La prima relazione che dimostra che questo processo di differenziazione sessuale delle gonadi è sensibile all'azione delle sostanze chimiche nella specie *Xenopus* risale agli anni 1950 (5) (6). L'esposizione di girini all'estradiolo durante questo periodo di differenziazione delle gonadi dà luogo a inversione sessuale dei maschi che, quando raggiungono l'età adulta, diventano femmine perfettamente funzionali (7) (8). Anche l'inversione funzionale sessuale delle femmine in maschi è possibile ed è stata riportata dopo l'impianto di tessuti testicolari nei girini (9). Tuttavia, sebbene anche l'esposizione a un inibitore dell'aromatasi determini l'inversione funzionale del sesso nella specie *X. tropicalis* (10), tale effetto non è stato osservato in *X. laevis*. Storicamente, gli effetti tossici sulla differenziazione delle

gonadi sono stati valutati mediante l'esame istologico delle gonadi al momento della metamorfosi e l'inversione sessuale poteva essere determinata soltanto mediante analisi del rapporto numerico tra i sessi. Fino a tempi recenti non esisteva alcun modo per determinare direttamente il sesso genetico della specie *Xenopus*. Tuttavia, la recente introduzione di marcatori sessuali nel *X. laevis* consente di determinare il sesso genetico e di individuare direttamente gli animali che hanno subito un cambiamento di sesso (11).

10. Nei giovani maschi, lo sviluppo procede man mano che aumentano i livelli di testosterone nel sangue, corrispondenti allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e dei testicoli. Nelle femmine, l'estradiolo è prodotto dalle ovaie, il che provoca l'apparizione della vitellogenina (VTG) nel plasma, degli oociti vitellogenicici nelle ovaie e lo sviluppo di ovidotti (12). Gli ovidotti sono caratteri sessuali secondari femminili che intervengono nella maturazione degli ovociti durante la riproduzione. Gli oociti si ricoprono di un involucro gelatinoso mentre transitano lungo l'ovidotto e si accumulano nell'ovisacco, pronti per la fecondazione. Lo sviluppo dell'ovidotto sembra essere regolato dagli estrogeni, poiché è correlato ai livelli di estradiolo nel sangue nelle specie *X. laevis* (13) e *X. tropicalis* (12). È stato segnalato lo sviluppo di ovidotti nei maschi a seguito di esposizione ai composti di policlorobifenili (14) e di 4-*terz*-ottilfenolo (15).

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. Il disegno sperimentale implica l'esposizione per via acquatica di embrioni di *X. laevis* allo stadio di sviluppo NF8-10 a quattro diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame e uno o più controlli fino a 10 settimane dopo il tempo mediano trascorso fino allo stadio NF62 nel controllo, con un sottocampione intermedio allo stadio NF62. Anche se può essere possibile somministrare sostanze chimiche fortemente idrofobe anche per via alimentare, finora esistono poche prove che hanno utilizzato questo canale di esposizione. Per ciascuna concentrazione di prova sono testate quattro repliche, con otto repliche per ciascun controllo utilizzato. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione comprendono quelli che costituiscono indicatori di tossicità generalizzata (ossia, la mortalità, il comportamento anomalo e gli indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli endpoint intesi a caratterizzare i meccanismi di azione della tossicità che colpiscono i processi fisiologici mediati dagli estrogeni, dagli androgeni o dalla tiroide (ossia, istopatologia della tiroide, istopatologia delle gonadi e del condotto gonadico, sviluppo anomalo, vitellogenina nel plasma (facoltativo) e rapporti numerici tra sessi genotipici/fenotipici).

CRITERI DI VALIDITÀ DELLA PROVA

12. Affinché la prova sia valida devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- la concentrazione dell'ossigeno disciolto è di ≥ 40 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata della prova;
 - la temperatura dell'acqua si situa nell'intervallo di 21 ± 1 °C e i differenziali tra le repliche e tra i trattamenti non superano 1.0 °C;
 - il pH della soluzione di prova è mantenuto tra 6,5 e 8,5 e i differenziali tra le repliche e tra i trattamenti non superano 0,5;
 - i dati disponibili dimostrano che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi;
 - la mortalità nel periodo di esposizione è ≤ 20 % in ciascuna replica nei controlli;
 - la vitalità è ≥ 70 % nelle uova selezionate per avviare lo studio;
 - il tempo mediano verso lo stadio NF62 dei controlli è di ≤ 45 giorni.
 - Il peso medio degli organismi di prova allo stadio NF62 e al completamento della prova nei controlli e nei controlli con solvente (se utilizzati) raggiunge rispettivamente $1,0 \pm 0,2$ e $11,5 \pm 3$ g.
13. Sebbene non sia un criterio di validità, si raccomanda che per l'analisi siano disponibili almeno tre livelli di trattamento con tre repliche non compromesse. Una mortalità eccessiva, tale da compromettere un trattamento, è definita come > 4 decessi (> 20 %) in 2 o più repliche che non possono essere spiegati da errori tecnici. Almeno tre livelli di trattamento privi di tossicità evidente sono disponibili per l'analisi. I segni di tossicità evidente possono comprendere, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, animali che galleggiano in superficie, giacciono sul fondo della vasca, nuotano in modo irregolare o inverso, non risalgono in superficie, non rispondono agli stimoli, presentano anomalie morfologiche (ad. es. deformità degli arti), lesioni emorragiche e edema addominale.
14. Se si osserva una deviazione rispetto ai criteri di validità della prova, le conseguenze vanno analizzate in relazione all'attendibilità dei risultati della prova; tali deviazioni e considerazioni vanno documentate nella relazione sulla prova.

DESCRIZIONE DEI METODI

Strumentazione

15. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

- (a) Apparecchio di controllo della temperatura (ad es. dispositivi di riscaldamento o raffreddamento regolabili a $21^\circ \pm 1$ °C);

- (b) termometro;
- (c) microscopio binoculare da dissezione e strumenti da dissezione;
- (d) macchina fotografica digitale con risoluzione minima di 4 megapixel e funzione micro (se necessario);
- (e) bilancia analitica, in grado di misurare fino a 0,001 mg or 1 µg;
- (f) misuratore di ossigeno disciolto e pH-metro;
- (g) misuratore dell'intensità luminosa in grado di fornire risultati in lux.

Acqua

Provenienza e qualità

16. Può essere usata l'acqua di diluizione disponibile localmente (ad esempio: acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone) che permetta la crescita e lo sviluppo normali dei girini di *X. laevis*; ciò deve essere comprovato da informazioni fattuali. Poiché la qualità dell'acqua può variare in modo significativo da una zona all'altra, la qualità dell'acqua è analizzata, in particolare in mancanza di dati storici sull'uso di tale acqua per allevare girini di anfibi. La misurazione di metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (es. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), di pesticidi, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata prima dell'inizio della sperimentazione e/o, ad esempio, ogni 6 mesi, ove sia noto che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 2.

Concentrazione di iodio nell'acqua utilizzata per la prova

17. Affinché la ghiandola tiroidea possa sintetizzare gli ormoni della tiroide per sostenere la normale metamorfosi, è necessario che le larve dispongano di un apporto sufficiente di iodio, amministrato mediante una combinazione di acqua e regime alimentare. Attualmente non esistono linee guida fondate su dati empirici per quanto riguarda le concentrazioni minime di iodio nei mangimi o nell'acqua necessarie per garantire un corretto sviluppo. Tuttavia, la disponibilità di iodio può compromettere la capacità di risposta del sistema tiroideo nei confronti delle sostanze attive sulla tiroide; è risaputo che essa influenza l'attività basale della ghiandola ed è pertanto necessario prendere in considerazione questo aspetto nell'interpretazione dei risultati dell'istopatologia della tiroide. Studi precedenti hanno dimostrato che il presente protocollo funziona correttamente quando le concentrazioni di ioduro (I^-) nell'acqua di diluizione sono comprese nell'intervallo tra 0,5 e 10 µg/l. Idealmente, la concentrazione minima di iodio nell'acqua di diluizione per tutta la durata della prova è di 0,5 µg/l (aggiunto sotto forma di sale di sodio o di potassio). Quando la prova è eseguita con acqua deionizzata, si deve aggiungere un supplemento di

iodio per raggiungere la concentrazione minima di 0,5 µg/l. Le concentrazioni misurate di iodio nell'acqua della prova (cioè, acqua di diluizione) e l'aggiunta di iodio o di altri sali (se utilizzati) sono riportate nella relazione. Il tenore in iodio può anche essere misurato nei mangimi, oltre che nell'acqua di prova.

Sistema di esposizione

18. La prova è stata sviluppata utilizzando un sistema di diluizione a flusso continuo. I componenti del sistema devono essere costituiti di materiale adatto al contatto con l'acqua, come il vetro, l'acciaio inossidabile e/o altri materiali chimicamente inerti. Le vasche di esposizione devono essere di vetro o di acciaio inossidabile, e il volume utilizzabile della vasca dovrebbe essere tra 4,0 e 10,0 l (con una profondità minima dell'acqua di 10-15 cm). Il sistema deve essere in grado di operare con tutte le concentrazioni di esposizione nonché un campione di controllo e un controllo con solvente, se del caso, con quattro repliche per livello di concentrazione e otto per i controlli. La portata del flusso verso ciascuna vasca deve essere costante, in modo da mantenere stabili le condizioni biologiche e l'esposizione chimica. Si raccomanda di mantenere una portata dell'acqua adeguata (ad esempio almeno 5 rinnovi di acqua al giorno) per evitare un calo della concentrazione della sostanza chimica a causa del metabolismo degli organismi sperimentali e dei microrganismi acquatici presenti nell'acquario, di vie di degradazione abiotica (idrolisi, fotolisi) o della dissipazione (volatilizzazione, adsorbimento). Le vasche sperimentali vanno distribuite a caso nel sistema di esposizione, in modo da diminuire gli eventuali effetti connessi alla posizione (incluse lievi variazioni di temperatura, dell'intensità luminosa, ecc.). Ulteriori informazioni sull'installazione di sistemi di esposizione a flusso continuo possono essere ottenute dal documento *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Somministrazione della sostanza chimica: preparazione delle soluzioni di prova

19. Per preparare le soluzioni di prova nel sistema di esposizione, si introduca nel sistema una soluzione madre della sostanza chimica in esame mediante una pompa o un altro strumento adeguato. La velocità di flusso della soluzione di riserva deve essere calibrata secondo i dati analitici relativi alle soluzioni di prova prima dell'inizio dell'esposizione, e sottoposta periodicamente a verifica volumetrica durante la prova. La soluzione di prova in ciascuna vasca va rinnovata al ritmo di un minimo di 5 rinnovi in volume/giorno.
20. Il metodo utilizzato per introdurre nel sistema la sostanza chimica in esame è variabile in funzione delle sue caratteristiche fisico-chimiche. Pertanto, prima della prova si devono ottenere informazioni di base sulla sostanza chimica che siano rilevanti per determinarne la stabilità. La formula strutturale, il peso molecolare, la purezza, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a e il K_{ow}, l'idrosolubilità (preferibilmente nel mezzo di prova), la pressione di

vapore e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità [metodo di prova C.4 (17) o C. 29 (18)] sono informazioni utili sulle proprietà specifiche della sostanza chimica in esame. La solubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica il rischio di perdite per evaporazione della sostanza chimica durante la prova. La conduzione di tale prova senza le informazioni di cui sopra deve essere considerata attentamente giacché il disegno sperimentale dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame e, in assenza di tali dati, i risultati possono essere di difficile interpretazione o apparire privi di senso. Occorre inoltre disporre di un metodo d'analisi affidabile per la determinazione quantitativa della sostanza chimica in esame nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura. Le sostanze chimiche in esame solubili in acqua possono essere disciolte in aliquote dell'acqua di diluizione ad una concentrazione che consenta di ottenere il rilascio della concentrazione sperimentale voluta mediante un sistema di flusso continuo. Le sostanze chimiche che sono liquide o solide a temperatura ambiente e moderatamente solubili in acqua possono richiedere saturatori liquido:liquido o liquido:solido (ad esempio, colonna di lana di vetro) (19). Anche se può anche essere possibile somministrare sostanze chimiche fortemente idrofobe attraverso i mangimi, esistono pochi metodi di prova che hanno utilizzato questo canale di esposizione.

21. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre è preparata di preferenza per semplice miscela o agitazione della sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione, con l'ausilio di mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne/sistemi di saturazione o metodi di dosaggio passivo (20). Vanno privilegiati i sistemi sperimentali che non fanno uso di co-solventi; tuttavia sostanze chimiche in esame diverse presentano proprietà fisico-chimiche diverse che richiedono approcci diversi di preparazione delle soluzioni acquose per l'esposizione chimica. Si deve tuttavia fare il possibile per evitare solventi e altri vettori in quanto: 1) alcuni solventi stessi possono rivelarsi tossici e/o indurre risposte endocrine indesiderate o inattese; 2) testare le sostanze chimiche ad una concentrazione superiore alla loro solubilità in acqua (il che avviene spesso se si usano solventi) può falsare la determinazione delle concentrazioni efficaci; e 3) il ricorso a solventi nelle prove può portare a lungo termine alla formazione significativa di biofilm associati all'attività microbica, che può avere un impatto sulle condizioni ambientali o sulla capacità di mantenere le concentrazioni di esposizione; 4) in assenza di dati storici che dimostrino che il solvente non influenza i risultati dello studio, l'uso di solventi richiede un trattamento di controllo con solvente che ha implicazioni significative per il benessere degli animali, in quanto sono necessari altri animali per condurre la prova. Nel caso di sostanze chimiche difficili da testare, il solvente può essere utilizzato soltanto come ultima istanza e si deve

consultare il documento *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (21) per stabilire la migliore metodologia da seguire. La scelta del solvente è determinata dalle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame e la disponibilità dei dati di controllo storici sui solventi. In mancanza di dati storici, occorre determinare l'idoneità di un solvente prima di procedere allo studio definitivo. Nel caso in cui l'uso di un solvente sia inevitabile e si verifichi un'attività microbica (biofilm), nel corso della prova si raccomanda di registrare/annotare nella relazione la presenza di biofilm per vasca (almeno una volta alla settimana). Idealmente, la concentrazione del solvente deve essere mantenuta costante nel controllo con solvente e in tutti i recipienti trattati. Se la concentrazione del solvente non è costante, nel controllo con solvente si deve usare la concentrazione più elevata di solvente per il trattamento. Se si utilizza un solvente come vettore, le concentrazioni massime di solventi non devono superare 100 µl/l o 100 mg/l (21) e si raccomanda di mantenere la concentrazione di solvente più bassa possibile (ad esempio, < 20 µl/l) per evitare potenziali effetti del solvente sugli endpoint misurati (22).

Animali sperimentali

Specie sperimentale

22. La specie sperimentale è *X. laevis* perché: 1) è allevata regolarmente nei laboratorio di tutto il mondo; 2) è facilmente ottenibile da fornitori commerciali; e 3) si tratta di una specie di cui si può determinare il sesso genetico.

Cura e riproduzione degli adulti

23. I metodi idonei di cura e riproduzione della specie *X. laevis* sono descritti in una linea guida standardizzata (23). Le condizioni di alloggiamento e di cura di *X. laevis* sono anch'esse descritte da Read (24). Per favorire la riproduzione, le coppie (3-5) di maschi e femmine adulti ricevono un'iniezione intraperitoneale di gonadotropina corionica umana (hCG). Agli esemplari maschi e femmine vengono iniettati, rispettivamente, circa 800-1000 UI e 500-800 UI di hCG disciolti in una soluzione salina a 0,6-0,9 % (o soluzione Ringer, una soluzione isotonica salina da utilizzare con gli anfibi; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). I volumi di iniezione devono essere di circa 10 µl/g di peso corporeo (~1000 µl). Successivamente, per stimolare la copulazione, le coppie riproduttrici indotte sono mantenute in grandi vasche, al riparo da perturbazioni e in condizioni statiche. Ciascuna vasca di riproduzione è dotata di un finto doppiofondo formato da una griglia di plastica o acciaio inossidabile (ad es. con maglie di 1,25 cm) che consenta alle uova di cadere sul fondo. Le rane che ricevono un'iniezione di hCG nel tardo pomeriggio depositano generalmente la maggior parte delle loro uova verso metà mattina del giorno successivo. Dopo la deposizione e la fecondazione di una quantità sufficiente di uova, gli adulti sono rimossi dalle vasche di riproduzione. Le

uova sono quindi raccolte e l'involucro gelatinoso è rimosso con trattamento di L-cisteina (23). Preparare una soluzione a 2 % di L-cisteina e adattare il pH a 8,1 con 1 M NaOH. Aggiungere questa soluzione a 21 °C in una beuta da 500 ml contenente le uova provenienti da un'unica deposizione e agitare delicatamente per uno o due minuti e successivamente sciacquare accuratamente 6-8 volte con acqua di coltura a 21 °C. Trasferire quindi le uova in un cristallizzatore e determinarne la vitalità, che deve essere > 70 % e gli embrioni in fase di divisione cellulare devono eventualmente presentare solo anomalie minime.

DISEGNO SPERIMENTALE

Concentrazioni di prova

24. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro concentrazioni della sostanza chimica in esame e adeguati controlli (compresi, se necessario, controlli con solvente). In generale, si raccomanda di intervallare le concentrazioni di un fattore non superiore a 3,2.
25. Ai fini della presente prova, i risultati degli studi esistenti sugli anfibi vanno utilizzati nella misura del possibile per determinare la concentrazione massima di prova, in modo da evitare concentrazioni manifestamente tossiche. Per determinare tale concentrazione si potrà ricorrere, ad esempio, alle relazioni quantitative struttura-attività, al metodo "read-across" e ai dati degli studi esistenti sugli anfibi quali il saggio sulla metamorfosi degli anfibi, il metodo di prova C.38 (25) e il saggio *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) e/o le prove sui pesci quali i metodi di prova C.48, C.41 e C.49 (26) (27) (28). Prima di avviare il LAGDA si può effettuare un esperimento di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (*range-finding*). Si raccomanda che l'esposizione per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni sia avviata entro 24 ore dalla fecondazione e continuata per 7-14 giorni (o più, se necessario) e le concentrazioni di prova siano tali che gli intervalli tra le concentrazioni di prova non siano superiori a un fattore 10. L'intervallo di concentrazioni ottenuto servirà a stabilire la concentrazione massima di prova nel LAGDA. Si noti che, se si utilizza un solvente, l'idoneità del solvente (cioè se può avere un impatto sull'esito dello studio) potrebbe essere determinata nel quadro del test di *range-finding*.

Repliche all'interno dei gruppi di trattamento e dei gruppi di controllo

26. Utilizzare almeno quattro repliche per concentrazione di prova e almeno otto repliche per i controlli (e, se necessario, il controllo con solvente) (cioè il numero di repliche nel controllo e l'eventuale controllo con solvente devono essere il doppio del numero di repliche di ciascun gruppo di trattamento, al fine di garantire un'adeguata potenza statistica). Ciascuna replica deve contenere al massimo 20 animali. Il numero minimo di animali trattati dovrebbe essere di 15 (5 per il sottocampione allo stadio NF62 e 10 allo stadio giovanile). Tuttavia, si aggiungono altri animali a ciascuna replica per tener conto della possibile mortalità, mantenendo il numero critico di 15.

PROCEDURA

Sintesi della prova

27. La prova è avviata con embrioni appena deposti (stadio NF8-10) e prosegue fino allo sviluppo delle giovani rane. Gli animali sono esaminati quotidianamente per verificare la mortalità e qualsiasi segno di comportamento anomalo. Allo stadio NF62 un sottocampione di larve (fino a 5 animali per replica) è prelevato per esaminare vari endpoint (tabella 1). Dopo che tutti gli animali hanno raggiunto lo stadio NF66, vale a dire il completamento della metamorfosi (o dopo 70 giorni dall'inizio della prova, se precedente), è effettuata una selezione casuale (ma senza sottocampionamento) di animali che saranno eliminati per ridurre il numero (10 per vasca) (cfr. il paragrafo 43) e i restanti animali continuano ad essere esposti fino a 10 settimane dopo il tempo mediano fino allo stadio di NF62 nel controllo. Al completamento della prova (campionamento delle rane giovani) sono effettuate ulteriori misurazioni (tabella 1).

Condizioni di esposizione

28. Una sintesi completa dei parametri del metodo figura nell'appendice 3. Durante il periodo di esposizione, l'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH delle soluzioni di prova sono misurati quotidianamente. La conduttività, l'alcalinità e la durezza sono misurate una volta al mese. Per la temperatura dell'acqua delle soluzioni di prova, i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti (nell'arco di un giorno) non devono superare 1.0 °C. Analogamente, per il pH delle soluzioni di prova, i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti non devono superare 0,5.
29. Le vasche di esposizione possono essere sifonate quotidianamente per rimuovere i resti di cibo non consumati e i prodotti di scarto, facendo attenzione ad evitare la contaminazione incrociata delle vasche. Si deve prestare la massima attenzione a ridurre al minimo lo stress e i traumi per gli animali, soprattutto durante i trasferimenti, la pulizia delle vasche e la manipolazione delle larve. Analogamente, va evitata qualsiasi attività o condizione

stressante, in particolare rumori forti e/o continui, picchiettamenti sulle vasche o vibrazioni nelle vasche.

Durata dell'esposizione alla sostanza chimica in esame

30. L'esposizione è avviata con embrioni appena deposti (stadio NF8-10) e prosegue fino a dieci settimane dopo il tempo mediano dello stadio NF62 (≤ 45 giorni dall'inizio della prova) nel gruppo di controllo. In generale, la durata del LAGDA è di 16 settimane (massimo 17 settimane).

Avvio della prova

31. Sarà stato precedentemente dimostrato che gli animali riproduttori utilizzati per l'avvio della prova sono in grado di generare discendenti geneticamente sessuati (appendice 5). Dopo la deposizione delle uova degli adulti, gli embrioni sono raccolti, trattati con cisteina in modo da eliminare lo strato gelatinoso e sottoposti a controlli per verificarne la vitalità (23). Il trattamento con cisteina consente di manipolare gli embrioni durante lo screening senza che aderiscano alle superfici. Lo screening avviene mediante un microscopio a dissezione utilizzando un contagocce di misura adeguata per rimuovere gli embrioni non vitali. È preferibile utilizzare per la prova embrioni di un'unica deposizione che presenti una vitalità superiore al 70 %. Gli embrioni allo stadio NF8-10 sono ripartiti in modo casuale in vasche di trattamento contenenti un volume adeguato di acqua di diluizione, fino a che ciascuna vasca contenga 20 embrioni. Gli embrioni vanno manipolati con cura durante il trasferimento per ridurre al minimo lo stress ed evitare qualsiasi lesione. Dopo 96 ore dalla fecondazione, i girini devono aver risalito la colonna d'acqua e aver cominciato ad aderire alle pareti della vasca.

Regime alimentare

32. Il regime e la frequenza di alimentazione nei vari stadi di vita di *X. laevis* rappresentano un aspetto molto importante del protocollo LAGDA. Un'alimentazione eccessiva durante la fase larvale determina generalmente un aumento dei casi di scoliosi e della loro gravità (appendice 8) e deve essere pertanto evitata. Per contro, un'alimentazione inadeguata durante la fase larvale si traduce in ritmi di sviluppo estremamente variabili tra i controlli, con il rischio di compromettere la potenza statistica o i risultati della prova. L'appendice 4 illustra il regime alimentare raccomandato per le larve e le rane giovani di *X. laevis* in condizioni di flusso continuo, ma sono ammesse alternative purché gli organismi sperimentali crescano e si sviluppino in modo soddisfacente. Giova notare che se sono misurati gli effetti sul sistema endocrino, si devono utilizzare mangimi privi di sostanze attive sul sistema endocrino quali la farina di soia.

Alimentazione delle larve

33. La dieta raccomandata è costituita da mangimi per l'alimentazione delle trote, da dischi di alghe *Spirulina* e da fiocchi per pesci rossi (ad esempio fiocchi di TetraFin[®], Tetra, Germania) mescolati in acqua di coltura (o di diluizione). Tale miscuglio è somministrato tre volte al giorno nei giorni infrasettimanali e una volta al giorno durante i fine settimana. I girini sono alimentati con naupli vivi (di 24 ore) di *Artemia*, due volte al giorno nei giorni infrasettimanali e una volta al giorno durante i weekend a partire dall'8° giorno dopo la fecondazione. L'alimentazione delle larve, che deve essere coerente in ciascuna vasca di prova, deve consentire crescita e sviluppo adeguati degli animali sperimentali, al fine di garantire la riproducibilità e la trasferibilità dei risultati della prova: 1) il tempo mediano fino allo stadio NF62 nel controllo deve essere di ≤ 45 giorni; e 2) è raccomandato un peso medio di $1,0 \pm 0,2$ g allo stadio NF62 nei controlli.

Alimentazione delle rane giovani

34. Una volta terminata la metamorfosi, il regime alimentare consiste di mangimi di prima scelta per gli anfibi di tipo 3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (appendice 4). Per i ranocchi (rane al primo stadio giovanile), il granulato è macinato velocemente in un macinacaffè o in un mixer o schiacciato con pestello in un mortaio per ridurne le dimensioni. Quando le rane giovani sono diventate sufficientemente grandi da consumare il granulato intero, la macinazione o la triturazione non sono più necessarie. Gli animali vanno nutriti una volta al giorno. L'alimentazione delle rane giovani deve permettere una crescita e uno sviluppo adeguati degli organismi: al completamento della prova è raccomandato un peso medio di $11,5 \pm 3$ g per le rane giovani di controllo.

Analisi chimiche

35. Prima di avviare la prova occorre determinare la stabilità della sostanza in esame (ad esempio, solubilità, degradabilità e volatilità) e stabilire tutti i metodi analitici necessari, ad esempio utilizzando le informazioni o le conoscenze disponibili. Se l'amministrazione delle dosi avviene attraverso l'acqua di diluizione, si raccomanda di analizzare ciascuna concentrazione delle vasche di replica prima dell'inizio della prova per verificare le prestazioni del sistema. Durante il periodo di esposizione, le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate ad intervalli appropriati, preferibilmente ogni settimana per almeno una replica in ciascun gruppo di trattamento, con rotazione delle repliche dello stesso gruppo di trattamento ogni settimana. Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati. Inoltre, il coefficiente di variazione (CV) delle concentrazioni di prova misurate nel corso dell'intero periodo di prova in un trattamento deve essere mantenuto uguale o inferiore a 20 % in ciascuna concentrazione. Se le concentrazioni

misurate non rientrano nell'80-120 % della concentrazione nominale (ad esempio, quando si testano sostanze fortemente biodegradabili o adsorbenti), occorre determinare le concentrazioni efficaci ed esprimerle in rapporto alla media aritmetica delle concentrazioni nelle prove a flusso continuo.

36. Le velocità di flusso dell'acqua di diluizione e della soluzione madre sono controllate a intervalli appropriati (ad esempio tre volte alla settimana) per tutta la durata dell'esposizione. Nel caso di sostanze chimiche che non possono essere rilevate ad alcune o a tutte le concentrazioni nominali (ad esempio, a causa di una rapida degradazione o adsorbimento nelle vasche di prova, o di un marcato accumulo di sostanze chimiche negli organismi degli animali esposti), si raccomanda di adeguare il tasso di ricambio della soluzione di prova in ciascuna vasca al fine di mantenere il più possibile costanti le concentrazioni di prova.

Osservazioni e misurazioni degli endpoint

37. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione sono quelli indicativi della tossicità, compresi mortalità, comportamenti anomali (ad es. segnali clinici di malattia e/o di tossicità generale) e indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli effetti patologici dovuti sia alla tossicità generale che ai meccanismi di azione endocrina che influiscono sui processi fisiologici mediati da estrogeni, androgeni o tiroide. Inoltre, la concentrazione di VTG nel plasma può essere misurata in via facoltativa al completamento della prova. La misurazione della VTG può essere utile per comprendere i risultati dello studio nel contesto dei meccanismi endocrini per i presunti interferenti endocrini. Gli endpoint misurati e la frequenza di misurazione sono riassunti nella tabella 1.

Tabella1: Panoramica degli endpoint del LAGDA

Endpoint*	Quotidiano	Campionamento intermedio (campioni di larve)	Conclusione della prova (campioni di esemplari giovani)
Mortalità e anomalie	X		
Tempo fino allo stadio NF62		X	
Isto(pato)logia (tiroide)		X	
Morfometria (crescita in peso e in lunghezza)		X	X
Indice epatosomatico (IES)			X
Rapporti numerici tra sessi genotipici/fenotipici			X

Istopatologia (gonadi, dotti riproduttivi, reni e fegato)			X
Vitellogenina (VTG) (facoltativo)			X

* Tutti gli endpoint sono analizzati statisticamente.

Mortalità e osservazioni giornaliere

38. Tutte le vasche sperimentali sono controllate quotidianamente per individuare animali morti e registrarne il numero per ciascuna vasca. Gli animali morti sono rimossi dalla vasca non appena individuati. Lo stadio di sviluppo degli animali morti va classificato come pre-stadio NF58 (che precede l'apparizione degli arti anteriori), tra gli stadi NF58 e NF62, tra gli stadi NF62 e NF63 (tra lo stadio NF62 e il completo assorbimento della coda) o stadio NF66 (post-larvale). I tassi di mortalità superiore al 20 % potrebbero indicare condizioni sperimentali inadeguate o effetti manifestamente tossici della sostanza chimica in esame. Gli animali tendono ad essere più sensibili a episodi di mortalità non dipendenti dalle sostanze chimiche durante i primi giorni di sviluppo che seguono la deposizione delle uova e durante il picco metamorfico. Tale mortalità può risultare dai dati relativi ai controlli.
39. Inoltre, qualsiasi osservazione di comportamenti anomali, malformazioni evidenti (ad esempio, scoliosi), o lesioni, deve essere annotata. Le osservazioni di scoliosi vanno contate (incidenza) e classificate in base alla gravità (ad esempio, non osservabile: NR, minima: 1, moderata: 2, grave 3; appendice 8). Sforzi devono essere compiuti per limitare la prevalenza di scoliosi moderate e gravi (ad esempio, inferiore al 10 % nei controlli) per tutta la durata dello studio, anche se una maggiore prevalenza di anomalie dei controlli non costituisce necessariamente un motivo per interrompere la prova. Si riscontra un comportamento normale quando le larve rimangono sospese nella colonna d'acqua, con la coda più alta della testa, battono la pinna caudale in modo ritmico e regolare, risalgono periodicamente in superficie, muovono gli opercoli e reagiscono agli stimoli. Viceversa, un comportamento anomalo implica, ad esempio, che gli animali galleggiano in superficie, rimangono immobili sul fondo della vasca, nuotano in modo inverso o irregolare, non risalgono in superficie, e non reagiscono agli stimoli. Per gli animali post-metamorfosi, oltre ai citati comportamenti anomali, vanno registrate le grandi differenze di consumo alimentare tra i gruppi trattati. Le malformazioni e le lesioni apparenti possono manifestarsi tra l'altro con anomalie morfologiche (ad esempio deformità dei membri), lesioni emorragiche, edema addominale e infezioni batteriche o micotiche. Le lesioni sulla testa nelle rane giovani, subito dietro le narici, possono essere indicative di livelli di umidità insufficienti. Tali determinazioni sono di natura qualitativa e sono considerate analoghe ai sintomi clinici di malattie o stress e sono il risultato di confronti con gli

animali di controllo. Un tasso di tali anomalie superiore nelle vasche esposte rispetto al gruppo di controllo costituisce la prova di una tossicità evidente.

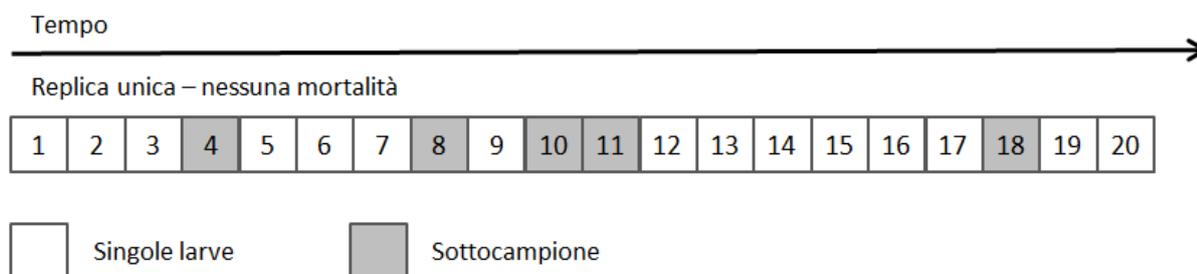
Sottocampione di larve

Descrizione generale della preparazione di sottocampioni di larve

40. I girini che hanno raggiunto lo stadio NF62 devono essere rimossi dalle vasche, campionati o spostati alla prossima fase dell'esposizione in una nuova vasca, oppure fisicamente separati dagli altri girini nella medesima vasca mediante un divisore. I girini sono controllati ogni giorno e viene annotato il giorno in cui ogni singolo girino raggiunge lo stadio NF62. La caratteristica distintiva nell'ambito di questa valutazione è la forma della testa. Quando la testa si è ridotta in misura tale da apparire approssimativamente della stessa larghezza del tronco del girino e gli arti anteriori hanno raggiunto il livello della metà del cuore, si considera che l'individuo ha raggiunto lo stadio NF62.
41. L'obiettivo è prelevare un campione di un totale di cinque girini allo stadio NF62 per vasca di replica. Il prelievo deve avvenire in modo assolutamente casuale, ma deve essere deciso precedentemente. La **figura 1** mostra un esempio ipotetico di vasca di replica. Se in una determinata vasca sopravvivono 20 girini quando il primo individuo raggiunge lo stadio NF62, sono selezionati cinque esemplari a caso tra 1 e 20. Il girino #1 è il primo individuo a raggiungere lo stadio NF62 e il girino #20 è l'ultimo individuo in una vasca a raggiungere lo stadio NF62. Analogamente, se vi sono 18 larve sopravvissute in una vasca, la selezione di 5 esemplari si farà a caso tra 1 e 18. La procedura va eseguita per ciascuna replica quando il primo individuo raggiunge lo stadio NF62. In caso di mortalità durante il campionamento dello stadio NF62, i campioni rimanenti devono essere nuovamente randomizzati in funzione di quante larve pre-stadio NF62 sono rimaste e di quanti altri campioni sono necessari per raggiungere un totale di cinque campioni da quella replica. Il giorno in cui un girino raggiunge lo stadio NF62, si consulta il diagramma di campionamento preparato per stabilire se tale individuo deve essere campionato o separato fisicamente dagli altri girini per continuare l'esposizione. Nell'esempio illustrato (figura 1), il primo individuo che ha raggiunto lo stadio NF62 (ad es. casella #1) è fisicamente separato dalle altre larve, prosegue l'esposizione e il giorno dello studio in cui tale esemplare raggiunge lo stadio NF62 viene annotato nella relazione. Successivamente, gli esemplari #2 e #3 sono sottoposti al medesimo trattamento del #1 e quindi l'esemplare #4 è prelevato per osservare gli indicatori di crescita e per procedere a un esame istologico della tiroide (secondo questo esempio). Questa procedura prosegue fino al momento in cui il 20° esemplare raggiunge gli altri esemplari che hanno superato lo stadio NF62 o è sottoposto a campionamento. La procedura random utilizzata deve garantire a tutti i girini la medesima probabilità di essere selezionati. Ciò può essere ottenuto con qualsiasi metodo di scelta

casuale, ma richiede anche che ciascun girino sia stato catturato con un retino a un certo punto durante il periodo di sottocampionamento prima di raggiungere lo stadio NF62.

Figura 1: Esempio ipotetico di regime di campionamento allo stadio NF62 in una singola vasca di replica.



42. Per il sottocampionamento larvale, gli endpoint ottenuti sono: 1) tempo fino allo stadio NF62 (ossia, numero di giorni tra la fecondazione e lo stadio NF62); 2) anomalie esterne; 3) morfometria (ad. es., peso e lunghezza); e 4) istologia della tiroide.

Soppressione incruenta dei girini

43. Il sottocampione di girini allo stadio NF62 (5 esemplari per replica) è soppresso immergendolo per 30 minuti in quantità appropriate (ad esempio 500 ml) di soluzione anestetica (ad esempio, soluzione a 0,3 % di MS-222, metan sulfonato di tricaina, CAS.886-86-2). La soluzione MS-222 deve essere tamponata con bicarbonato di sodio a un pH di circa 7,0, in quanto la soluzione MS-222 non tamponata è acida e irritante per la pelle della rana, causa di un limitato assorbimento e un'inutile stress supplementare per gli organismi.
44. Mediante retino, un girino è rimosso dalla vasca sperimentale e trasferito (immerso) nella soluzione anestetica. Dopo l'eliminazione incruenta eseguita correttamente, l'animale è pronto per l'autopsia quando non è più in grado di reagire agli stimoli esterni, come il pizzicamento dell'arto posteriore con un paio di pinze.

Morfometria (peso e lunghezza)

45. Le misurazioni del peso umido (al mg) e della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL) (a 0,1 mm) di ciascun girino vanno effettuate immediatamente non appena il girino non risponde più agli stimoli sotto l'effetto dell'anestesia (figura 2a). Si può utilizzare un software di analisi delle immagini per misurare la SVL a partire da una fotografia. I girini devono essere asciugati per tamponamento prima di essere pesati in modo da rimuovere l'acqua in eccesso. Dopo la misurazione delle dimensioni del corpo (peso e SVL), si raccomanda di registrare o annotare qualsiasi alterazione morfologica grave e/o segni clinici di tossicità quali scoliosi (cfr. appendice 8), petecchie ed emorragie; si raccomanda

di utilizzare uno strumento digitale per documentare le anomalie. La petecchia è una piccola emorragia puntiforme, di colore rosso o violaceo, dei capillari della pelle.

Raccolta e fissazione dei tessuti

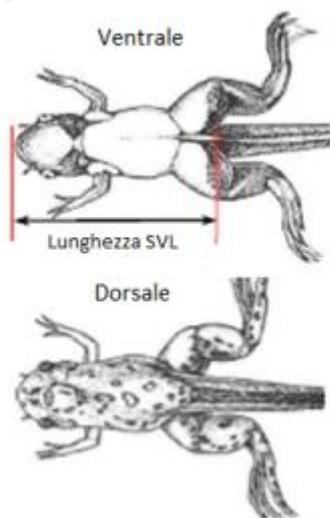
46. Le ghiandole tiroidee del sottocampione di larve sono esaminate in vista dell'analisi istologica. La parte inferiore del torso situata dietro agli arti anteriori è rimossa ed eliminata. La carcassa dissezionata è fissata nel fissativo di Davidson. Il volume di fissativo nella vasca deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Il fissativo è agitato o fatto roteare in modo idoneo per fissare adeguatamente i tessuti in esame. Tutti i tessuti rimangono nel fissativo di Davidson per almeno 48 ore, ma non più di 96 ore; sono quindi sciacquati in acqua deionizzata e conservati in formalina al 10 % neutra tamponata (1) (29).

Istologia della tiroide

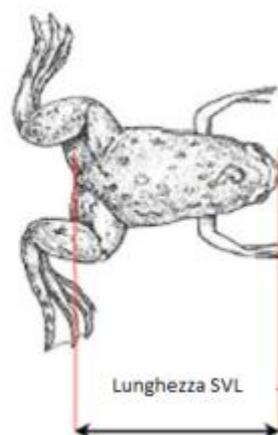
47. Ciascun sottocampione di larve (tessuti fissati) è sottoposto ad analisi istologica delle ghiandole della tiroide, al fine di effettuare una diagnosi e valutare l'indice di gravità (29) (30).

Figura 2: Parametri per la misurazione della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca nel LAGDA nei girini allo stadio NF62 (a) e nelle rane giovani (b). Le caratteristiche distintive dello stadio NF62 (a): la testa ha la stessa larghezza del tronco, la lunghezza del nervo olfattivo è più corta del diametro del bulbo olfattivo (vista dorsale), e gli arti anteriori sono al livello del cuore (vista ventrale). Immagini adattate da Nieuwkoop e Faber (1994).

a. Sottocampione di larve (stadio NF 62)



b. Campione di rane giovani



Fine dell'esposizione larvale

48. Dato il numero iniziale di girini, si prevede che vi sarà probabilmente una piccola percentuale di individui che non si sviluppano normalmente e non effettuano la

metamorfosi (NF66) in un lasso di tempo ragionevole. La parte larvale dell'esposizione non deve superare i 70 giorni. I girini rimasti alla fine di questo periodo devono essere soppressi in modo non cruento (cfr. paragrafo 43); vanno misurati il peso umido e la SVL, lo stadio di sviluppo è stabilito secondo il metodo di Nieuwkoop e Faber, 1994, e le eventuali anomalie di sviluppo sono registrate.

Eliminazione dopo lo stadio NF66

49. Dieci individui per vasca sono conservati a partire dallo stadio NF66 (riassorbimento totale della coda) fino al completamento dell'esposizione. Pertanto, dopo che tutti gli animali hanno raggiunto lo stadio NF66 o 70 giorni (a seconda di quale condizione si verifica prima), è opportuno procedere alla loro eliminazione. Gli animali che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo NF66, ma che non saranno conservati per continuare l'esposizione sono scelti a caso.
50. Gli animali non selezionati per continuare l'esposizione sono soppressi in modo incruento (cfr. paragrafo 43). Lo stadio di sviluppo, il peso umido e la SVL (figura 2b) sono misurati e ciascun animale è sottoposto a necropsia macroscopica. Il sesso fenotipico (in base alla morfologia delle gonadi) è registrato come femmina, maschio o indeterminato.

Campioni di rane giovani

Descrizione generale della preparazione di campioni di rane giovani

51. Gli animali restanti continuano ad essere esposti fino a 10 settimane dopo il tempo mediano fino allo stadio NF66 nel controllo contenente l'acqua di diluizione (e/o del controllo con solvente, se del caso). Alla fine del periodo di esposizione, i rimanenti animali (massimo 10 rane per replica) sono soppressi in modo incruento e i vari endpoint sono misurati o valutati e registrati: 1) morfometria (peso e lunghezza); 2) rapporti numerici tra i sessi fenotipici/genotipici; 3) peso del fegato (indice epato-somatico); 4) esame istopatologico (gonadi, dotti riproduttivi, fegato e reni) e, facoltativamente, 5) VTG nel plasma.

Soppressione incruenta delle rane

52. I campioni di rane allo stadio giovanile (post-metamorfosi), sono soppressi con un'iniezione intraperitoneale di anestetico, ad esempio 10 % MS-222 in una idonea soluzione tamponata di fosfato. Le rane possono essere prelevate quando non reagiscono più agli stimoli (in genere circa 2 minuti dopo l'iniezione, se si usa il 10 % di MS-222 in un

dosaggio di 0,01 ml per g di rana). Sebbene le rane allo stadio giovanile possano essere immerse in una concentrazione più elevata di anestetico (MS-222), l'esperienza ha dimostrato che questo metodo richiede più tempo e che tale durata può non essere adeguata per il campionamento. L'iniezione permette di sopprimere gli animali in modo incruento, efficiente e rapido prima del campionamento, che non deve essere avviato fino a quando non sia stata confermata la mancanza di reattività delle rane per assicurarsi che gli animali siano effettivamente morti. Se le rane presentano segni di manifesta sofferenza (cioè elevatissime sofferenze e probabile morte) o sono moribonde, gli animali devono essere anestetizzati e soppressi in modo incruento e trattati come casi di mortalità ai fini dell'analisi dei dati. Se una rana viene soppressa per morbilità, ciò viene annotato nella relazione sulla prova. A seconda del momento durante la prova in cui la rana è soppressa, l'animale può essere conservato per l'analisi istopatologica (mantenendolo in fissativo per un'eventuale esame istopatologico).

Morfometria (peso e lunghezza)

53. Le misurazioni del peso umido e della SVL (figura 2b) sono identiche a quelle descritte per il sottocampione di larve.

VTG nel plasma (facoltativo)

54. La VTG è un biomarcatore comunemente accettato, derivante dall'esposizione a sostanze chimiche estrogeniche. Per il LAGDA, la VTG del plasma può essere facoltativamente misurata all'interno dei campioni di rane giovani (ciò può essere particolarmente rilevante se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia un estrogeno).
55. Gli arti posteriori delle rane giovani sopresse sono sezionati e il sangue raccolto con un tubo capillare eparinato (anche se metodi alternativi di raccolta del sangue, come la puntura cardiaca, possono essere adatti). Il sangue è espulso in una provetta da microcentrifuga (ad esempio di 1,5 ml di volume) e centrifugato per ottenere il plasma. I campioni di plasma devono essere conservati a una temperatura pari o inferiore a -70 °C fino alla misurazione della VTG. La concentrazione di VTG nel plasma può essere misurata mediante una prova di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) (appendice 6) o un metodo alternativo, ad esempio la spettrometria di massa (31). Gli anticorpi specifici della specie sono preferibili a motivo della loro maggiore sensibilità.

Determinazione del sesso genetico

56. Il sesso genotipico di ogni rana giovane è valutato in base ai marcatori sviluppati da Yoshimoto *et al.* Per determinare il sesso genotipico, una porzione (o la totalità) di un arto posteriore (o di qualsiasi altro tessuto) è prelevato durante la dissezione e conservato in una provetta da microcentrifuga (i campioni di tessuto possono essere prelevati da qualsiasi tessuto). Il tessuto può essere conservato a una temperatura pari o inferiore a -

20 °C fino all'isolamento dell'acido desossiribonucleico (DNA). L'isolamento del DNA da tessuti può essere effettuato con kit disponibili in commercio e la presenza o l'assenza del marcatore è analizzata con il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR) (appendice 5). In genere, la concordanza tra sesso istologico e genotipo negli animali di controllo al momento del campionamento delle rane allo stadio giovanile del gruppo di controllo è superiore al 95 %.

Raccolta e fissazione dei tessuti per l'istopatologia

57. Le gonadi, i dotti di riproduzione, i reni e i fegati sono raccolti per l'esame istologico durante il campionamento finale. La cavità addominale è aperta e il fegato dissezionato e pesato. Successivamente, gli organi digestivi (ad. es. stomaco, intestini) sono rimossi con cura dalla parte inferiore dell'addome per far apparire le gonadi, i reni e i dotti di riproduzione. Va presa nota di qualsiasi anomalia morfologica grossolana delle gonadi. Infine, sono rimossi gli arti posteriori se non sono già stati precedentemente rimossi per la raccolta del sangue. I fegati raccolti e la carcassa con le gonadi conservate *in situ* sono collocati immediatamente nel fissativo di Davidson. Il volume di fissativo nel contenitore deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Tutti i tessuti rimangono nel fissativo di Davidson per almeno 48 ore, ma non più di 96 ore; sono quindi sciacquati in acqua deionizzata e conservati in formalina al 10 % neutra tamponata (1) (29).

Esame istopatologico

58. Ciascun campione di rana giovane è sottoposto ad analisi istologica per individuare patologie nelle gonadi, nei dotti di riproduzione, nei reni e nei tessuti epatici (32). Anche il fenotipo delle gonadi è osservato in tale valutazione (ad esempio, ovaie, testicoli, ermafroditismo); insieme alla caratterizzazione del sesso genotipico di ciascun individuo, le osservazioni possono servire per calcolare rapporti numerici tra sessi fenotipici/genotipici.

COMUNICAZIONE DEI DATI

Analisi statistica

59. Il LAGDA genera tre tipologie di dati che vanno analizzati statisticamente: 1) dati quantitativi continui (peso, SVL, LSI, VTG); 2) dati relativi ai tempi che precedono le varie manifestazioni concernenti i ritmi di sviluppo (ad es., giorni fino al raggiungimento dello stadio NF62 a partire dall'avvio della prova); e 3) dati ordinali sotto forma di indici di gravità relativi o di stadi di sviluppo, derivanti dalle valutazioni istopatologiche.

60. Se si deve determinare la NOEC o la EC_x, si raccomanda che il disegno sperimentale e la prova statistica prescelta abbiano una potenza tale da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint. È preferibile effettuare le analisi

statistiche dei dati (generalmente, sulla base della media delle repliche) seguendo le procedure descritte nel documento intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application* (33). L'appendice 7 del presente metodo di prova illustra l'albero delle decisioni raccomandato per l'analisi statistica e dà indicazioni per il trattamento dei dati e per la scelta del test o modello statistico più appropriato da utilizzare nel LAGDA.

61. I dati ottenuti dai campioni di rane giovani (ad esempio, crescita, LSI) sono analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico, poiché il sesso genotipico è determinato per tutte le rane.

Considerazioni relative all'analisi dei dati

Utilizzo di repliche e di trattamenti compromessi

62. Repliche e trattamenti possono essere compromessi a causa della mortalità eccessiva dovuta a tossicità evidente, malattia o errore tecnico. Se un trattamento è compromesso da malattia o errore tecnico, tre trattamenti non compromessi e tre repliche non compromesse devono essere disponibili per l'analisi. Se una tossicità evidente si manifesta nel o nei trattamenti più forti, è preferibile che almeno tre livelli di trattamento con tre repliche non compromesse siano disponibili per l'analisi [conformemente all'approccio della concentrazione massima tollerata applicato nelle linee guida dell'OCSE per i metodi di prova (34)]. Oltre alla mortalità, i segni di tossicità manifesta possono includere effetti comportamentali (ad esempio animali galleggianti sulla superficie, che giacciono sul fondo della vasca, nuotano in modo irregolare o in direzione inversa, non salgono in superficie), lesioni morfologiche (ad esempio lesioni emorragiche, edema addominale) o inibizione delle reazioni alimentari normali se paragonate agli animali di controllo sotto il profilo qualitativo.

Controllo con solvente

63. Al completamento della prova, vanno valutati i potenziali effetti del solvente (se utilizzato), mediante un confronto statistico tra il gruppo di controllo con solvente e il gruppo di controllo con acqua di diluizione. I principali parametri da valutare in questo contesto sono gli indicatori di crescita (peso e lunghezza), poiché essi sono sensibili alla tossicità generale. Se tra i gruppi di controllo contenente acqua di diluizione e i gruppi di controllo con solvente vengono rilevate differenze statisticamente significative, si dovrebbe ricorrere al giudizio professionale di un esperto per stabilire se la validità della prova è compromessa. Se i due controlli differiscono, i controlli esposti alla sostanza chimica devono essere confrontati con il controllo con solvente, a meno che non sia noto

che è preferibile effettuare il confronto con il controllo contenente acqua di diluizione. Se non vi sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi di controllo, si raccomanda di confrontare i controlli esposti alla sostanza chimica in esame con i due gruppi di controllo (solvente e acqua di diluizione), a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il solo gruppo di controllo contenente l'acqua di diluizione o con il solo gruppo di controllo contenente il solvente.

Relazione sulla prova

64. I seguenti dati devono figurare nella relazione sulla prova:

Sostanza chimica in esame

- natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche
- Sostanza monocostrituente:
 - aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;
 - identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o le impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).
- Sostanza multicostrituente, UVCB e miscele:
 - caratterizzata nella massima misura possibile mediante identità chimica (cfr. sopra), la presenza quantitativa e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie sperimentale:

- nome scientifico, ceppo, se disponibile, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.
- Incidenza della scoliosi nei controlli storici della coltura madre utilizzata.

Condizioni sperimentali:

- fotoperiodo/i;
- disegno sperimentale (ad esempio, dimensioni della vasca di prova, materiale e volume d'acqua, numero di vasche di prova e repliche, numero di organismi di prova per replica);
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);
- metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);

- efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati, rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;
- caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), iodio totale, carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;
- concentrazioni nominali di prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard;
- qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, temperatura (giornaliera) e concentrazione di ossigeno disciolto;
- informazioni dettagliate sul regime alimentare (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati:

- Dati comprovanti il fatto che i controlli hanno soddisfatto i criteri di validità;
- dati relativi al gruppo di controllo (più il controllo con solvente se utilizzato) e i gruppi trattati come segue: mortalità e anomalie osservate, tempo fino allo stadio NF62, esame istologico della tiroide (solo campione di larve), crescita (solo peso e lunghezza), LSI (solo campione di rane giovani), rapporti numerici tra i sessi fenotipici/genotipici (solo campione di rane giovani), risultati dell'esame istopatologico delle gonadi, dei dotti riproduttivi, dei reni e del fegato (solo campione di rane giovani) e la VTG nel plasma (se misurata, solo campione di rane giovani);
- approccio seguito per l'analisi statistica e per il trattamento dei dati (test o modello statistico utilizzato);
- concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta valutata;
- concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) per ogni risposta valutata (a $\alpha = 0,05$); EC_x per ogni risposta valutata, se del caso, e intervalli di confidenza (95 %, ad esempio), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori standard.
- Eventuali deviazioni dal metodo di prova e dai criteri di accettazione e considerazioni relative alle potenziali conseguenze sui risultati della prova.

65. Per i risultati delle misurazioni degli endpoint, vanno presentati i valori medi e le rispettive deviazioni standard (se possibile, per replica e per concentrazione).
66. Il tempo mediano verso lo stadio NF62 nei controlli è calcolato e presentato come media delle mediane delle repliche e della loro deviazione standard. Analogamente, per i trattamenti è necessario calcolare una mediana del trattamento presentandola come media delle mediane delle repliche e della loro deviazione standard.

BIBLIOGRAFIA

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della pronta biodegradabilità.
- (18) Capitolo C.29 del presente allegato, [Pronta biodegradabilità — CO₂ in recipienti ermetici](#).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69-92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Capitolo C.38 del presente allegato, Prova sulla metamorfosi degli anfibi.
- (26) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci.
- (27) Capitolo C.41 del presente allegato, Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci.
- (28) Capitolo C.49 del presente allegato — Prova di tossicità acuta sugli embrioni di pesci.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (34) Hutchinson TH, [Bögi C](#), [Winter MJ](#), [Owens JW](#), 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. [Aquatic Toxicology](#) 91(3): 197-202.

Appendice 1

DEFINIZIONI

Endpoint apicale: indicatore di effetti a livello della popolazione.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): prova di immunoassorbimento enzimatico

EC_x: (concentrazione con effetto dell'*x* %): la concentrazione che provoca un effetto nell'*x* % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC₅₀ è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

dpf: (*days post fertilization*) giorni dopo la fecondazione.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni testate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

HPG (*Hypothalamic-pituitary-gonadal*) **Axis:** asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* — Unione internazionale di chimica pura e applicata.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): concentrazione più bassa testata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte, occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC). L'appendice 7 fornisce orientamenti al riguardo.

Concentrazione letale mediana (LC₅₀): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (notazione semplificata lineare delle molecole).

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente

metodo di prova.

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

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare.

Appendice 2**ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE**

Sostanza	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	50 ng/l
Cloro organico totale	25 ng/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

Appendice 3**CONDIZIONI SPERIMENTALI PER IL LAGDA**

1. Specie sperimentale	<i>Xenopus laevis</i>
2. Tipo di prova	Flusso continuo
3. Temperatura dell'acqua	La temperatura nominale è di 21 °C. La temperatura media durante la prova è di 21 ± 1 °C (i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti non devono superare 1,0 °C)
4. Qualità dell'illuminazione	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro) 600-2000 lux (lumen/m ²) sulla superficie dell'acqua
5. Fotoperiodo	12 ore di luce, 12 ore di buio
6. Volume della soluzione di prova e vasca di prova (vasca)	4-10 l (profondità minima dell'acqua 10-15 cm) Vasca di vetro o di acciaio inossidabile
7. Rinnovo delle soluzioni di prova, in volume	Costante, in considerazione sia del mantenimento delle condizioni biologiche che dell'esposizione chimica (ad esempio, rinnovo del volume di 5 vasche al giorno)
8. Età degli organismi sperimentali all'avvio della prova	Stadio 8-10 secondo Nieuwkoop e Faber (NF)
9. Numero di organismi per replica	20 animali (embrioni)/ vasca (replica) all'inizio dell'esposizione e 10 animali (rane allo stadio giovanile)/ vasca (replica) dopo lo stadio NF66 fino al completamento dell'esposizione
10. Numero di trattamenti	Minimo 4 trattamenti per la sostanza chimica in esame più controlli appropriati
11. Numero di repliche per trattamento	4 repliche per trattamento per la sostanza chimica in esame e 8 repliche per il o i controlli
12. Numero di organismi per concentrazione di prova	Minimo 80 animali per trattamento per la sostanza chimica in esame e minimo 160 animali per il o i controlli
13. Acqua di diluizione	Qualsiasi acqua che consenta la crescita e lo sviluppo normali di <i>X. laevis</i> (ad esempio, acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone)
14. Aerazione	Non è obbligatoria, ma l'aerazione delle vasche può essere necessaria se i livelli di ossigeno disciolto scendono al di sotto dei limiti raccomandati e se il flusso della soluzione di prova è portato al

	massimo.
15. Ossigeno disciolto della soluzione di prova	Ossigeno disciolto: ≥ 40 % del valore di saturazione dell'aria o $\geq 3,5$ mg/l
16. pH della soluzione di prova	6.5-8.5 (i differenziali inter-replica e inter-trattamenti non devono superare 0,5).
17. Durezza e alcalinità della soluzione di prova	10-250 mg CaCO ₃ /l
18. Regime alimentare	(Cfr. appendice 4).
19. Periodo d'esposizione	Dallo stadio NF8-10 fino a dieci settimane dopo il tempo mediano verso lo stadio NF62 nel gruppo di controllo contenente l'acqua di diluizione e/o il solvente (massimo 17 settimane)
20. Endpoint biologici	Mortalità (e anomalie morfologiche), tempo verso lo stadio NF62 (campione di larve), istologia della tiroide (campione di larve), crescita (peso e lunghezza), indice epatico-somatico (campione di rane giovani), rapporti numerici tra i sessi genotipici/fenotipici (campione di rane giovani), istopatologia delle gonadi, dei dotti di riproduzione, dei reni e del fegato (campione di rane giovani) e della vitellogenina nel plasma (campione di rane giovani) (facoltativo).
21. Criteri di validità della prova	L'ossigeno disciolto è > 40 % del valore di saturazione dell'aria; la temperatura media dell'acqua si situa nell'intervallo di $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti sono $< 1,0^\circ\text{C}$; il pH della soluzione di prova è compreso tra 6,5 e 8,5; la mortalità nei controlli è ≤ 20 % in ciascuna replica e il tempo medio verso lo stadio NF62 nel controllo è ≤ 45 giorni; il peso medio degli organismi di prova nello stadio NF62 e al completamento della prova nei controlli e nei controlli con solvente (se utilizzati) raggiunge rispettivamente $1,0 \pm 0,2$ e $11,5 \pm 3$ g.; i dati disponibili dimostrano che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi.

Appendice 4

REGIME ALIMENTARE

Giova osservare che, sebbene il presente regime alimentare sia raccomandato, si possono prevedere alternative a condizione che gli organismi di prova crescano e si sviluppino a un ritmo adeguato.

Alimentazione delle larve

Preparazione del mangime da somministrare alle larve

- A. 1:1 (v/v) Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente);
1. Trout Starter: miscelare 50 g di Trout Starter (granuli fini o polvere) e 300 ml di acqua filtrata adeguata in un miscelatore ad alta velocità per 20 secondi
 2. miscela Algae/TetraFin® (o equivalente): miscelare 12 g di dischi di spirulina con 500 ml di acqua filtrata in un miscelatore ad alta velocità per 40 secondi, miscelare 12 g di Tedrain® (o equivalente) con 500 ml di acqua filtrata e poi mescolare il tutto fino ad ottenere 1 l di 12 g/l di dischi di spirulina con 12 g/litro di Tetrafin® (o equivalente).
 3. Mescolare uguali volumi della miscela di Trout Starter e della miscela di alghe/TetraFin® (o equivalente)
- B. Artemie:

Far schiudere 15 ml di uova di artemia in 1 l di acqua salata (preparato aggiungendo 20 ml di NaCl a 1 l di acqua deionizzata). Dopo aver aerato per 24 ore a temperatura ambiente a luce costante, si procede alla raccolta delle artemie. In sintesi, l'arresto dell'aerazione permette alle artemie di depositarsi in 30 min. Le cisti che galleggiano sulla superficie della vasca sono ritirate e eliminate, quindi le artemie sono filtrate adeguatamente e immerse in 30 ml di acqua filtrata.

Protocollo di alimentazione

La tabella 1 contiene un riferimento al tipo e alla quantità di mangime somministrato alle larve durante l'esposizione. Gli animali devono essere alimentati tre volte al giorno dal lunedì al venerdì e una volta al giorno durante il fine settimana.

Tabella 1: Regime alimentare per le larve di *X. laevis* nelle condizioni di flusso continuo

Tempo* (post fecondazione)	Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente)		Artemie	
	Giorno infrasettimanale (3 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)	Giorno infrasettimanale (2 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)

Giorni 4-14 (nelle settimane 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (nei giorni 8-15)	0,5 ml (nei giorni 8-15)
Settimana 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (dal giorno 16)	1 ml (dal giorno 16)
Settimana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Settimana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Settimana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Settimana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Settimana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Settimane 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Il giorno 0 corrisponde al giorno dell'iniezione di hCG.

Variazione di regime alimentare tra lo stadio larvale e lo stadio giovanile

Quando hanno completato la metamorfosi, le larve transitano verso il regime alimentare per le rane giovani, descritto di seguito. Durante tale transizione, le razioni alimentari somministrate alle larve sono ridotte proporzionalmente all'incremento delle razioni somministrate alle rane giovani in ciascun gruppo di cinque girini che hanno superato lo stadio NF62 e si avvicinano al completamento della metamorfosi (stadio NF66).

Alimentazione delle rane giovani

Regime alimentare degli esemplari allo stadio giovanile

Una volta completata la metamorfosi (stadio NF66), il regime di alimentazione cambia: sono somministrati solo mangimi di prima scelta di tipo 3/32 pollici (Xenopus Express™, FL, USA), o equivalenti.

Preparazione di granulati per la transizione dallo stadio larvale a quello giovanile

Il mangime in granuli per anfibi è macinato brevemente in un macinacaffè, in un mixer o con mortaio e pestello, in modo da ridurre la dimensione dei granuli di circa 1/3. Si sconsiglia una macinazione troppo lunga, che trasformerebbe il granulato in polvere.

Protocollo alimentare

La **tabella 2** contiene un riferimento al tipo e alla quantità di mangime somministrato durante lo stadio giovanile e lo stadio adulto. Gli animali vanno nutriti una volta al giorno. Si noti che, nel corso della metamorfosi, gli animali continuano a ricevere una razione di artemidi fino a che > 95 % degli animali hanno completato la metamorfosi.

Gli animali non devono essere nutriti il giorno del completamento della prova in modo da

non falsare il risultato delle misurazioni del peso.

Tabella 2: Regime alimentare per le rane giovani di *X. laevis* nelle condizioni di flusso continuo. Si noti che gli animali non metamorfizzati, compresi quelli la cui metamorfosi è stata ritardata dal trattamento chimico, non possono mangiare granuli non macinati.

Tempo (Settimane che seguono la data mediana della metamorfosi)	Mangime macinato (mg per ranocchietto)	Mangime intero (mg per ranocchietto)
Durante la metamorfosi degli animali	25	0
Settimane 0-1	25	28
Settimane 2-3	0	110
Settimane 4-5	0	165
Settimane 6-9	0	220

* Il primo giorno della settimana 0 corrisponde alla data mediana di metamorfosi degli animali di controllo.

Appendice 5

DETERMINAZIONE DEL SESSO GENOTIPICO

Il metodo di determinazione del sesso genotipico nella specie *Xenopus laevis* si basa su Yoshimoto *et al.*, 2008. Le procedure dettagliate di genotipizzazione possono essere ottenute da tale pubblicazione, se necessario. Si possono utilizzare metodi alternativi (ad esempio PCR quantitativa in modalità *high-throughput*).

Primer di *X. laevis*

Marcatore DM-W

Senso: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antisenso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Controllo positivo

Senso: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antisenso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificazione del DNA

Purificare il DNA dal tessuto muscolare o cutaneo, usando ad esempio il Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69506) o prodotto simile secondo le istruzioni del kit. Il DNA può essere eluito mediante colonnine da centrifuga utilizzando meno tampone per ottenere campioni più concentrati, se ritenuto necessario per la PCR. Si noti che il DNA è piuttosto stabile, pertanto si deve fare attenzione ad evitare contaminazioni incrociate che potrebbero causare un'erronea caratterizzazione di maschi come femmine, o viceversa.

PCR

Nella tabella 1 è riportato un protocollo di campionamento con il metodo JumpStart™ *Taq* di Sigma.

Tabella 1: Protocollo di campionamento con il metodo JumpStart™ Taq di Sigma.

Master Mix	1x (µl)	[finale]
NFW	11	-
Tampone 10x	2,0	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM ciascuno)	0,4	200 µM
Marcatore per il primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marcatore per il primer antisenso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controllo per il primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controllo per il primer antisenso (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unità/µl
Matrice di DNA	1,0	~200 pg/µl

Nota: Al momento della preparazione del Master Mix, preparare una quantità di miscela supplementare per tener conto di eventuali perdite durante il pipettaggio (ad esempio: utilizzare 25x solo per 24 reazioni).

Reazione:

Master Mix	19.0 µl
Modello	1.0 µl
Totale	<u>20.0 µl</u>

Profilo del termociclatore:

Fase 1.	94 °C 1 min
Fase 2.	94 °C 30 secondi
Fase 3.	60 °C 30 secondi
Fase 4.	72 °C 1 min
Fase 5.	Passare alla fase 2. 35 cicli
Fase 6.	72 °C 1 min
Fase 7.	mantenere a 4 °C.

I prodotti della PCR possono essere collocati immediatamente in gel o conservati a 4 °C.

Elettroforesi su gel di agarosio (3 %) (protocollo per il campione)*50X TAE*

Tris 24,2 g
Acido acetico glaciale 5,71 ml
Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
Aggiungere acqua fino a 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
50X TAE 8 ml

3:1 Agarosio

3 parti di agarosio NuSieve™ GTG™
1 parte di agarosio di Fisher a debole elettroendosmosi (EEO)

Metodo

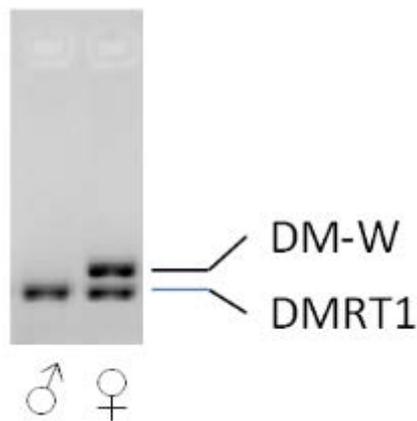
1. Preparare un gel al 3 % aggiungendo 1,2 g di miscela d'agarosio a 43 ml di TAE 1X. Agitare fino a disgregare le agglutinazioni.
2. Scaldare la miscela di agarosio al microonde fino a dissoluzione completa (evitando il punto di ebollizione). Lasciar raffreddare leggermente.
3. Aggiungere 1,0 µl di bromuro di etidio (10 mg/ml). Agitare il flacone. Si noti che il bromuro di etidio è mutageno, pertanto è possibile utilizzare sostanze chimiche alternative, nella misura in cui ciò sia tecnicamente possibile, per ridurre al minimo i rischi per la salute dei lavoratori¹.
4. Colare il gel nello stampo con il pettine. Raffreddare completamente.
5. Aggiungere il gel all'apparecchiatura. Ricoprire il gel di TAE 1X.

¹ A norma dell'articolo 4, paragrafo 1, della direttiva 2004/37/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro (sesta direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1, della direttiva 89/391/CEE del Consiglio) (GU L 158 del 30.4.2004, pag. 50).

6. Aggiungere 1 μ l di 6x colorante di dissociazione a ciascun volume di 10 μ l di prodotto PCR.
7. Trasferire mediante pipetta i campioni nei pozzetti.
8. Effettuare l'elettroforesi a 160 volt costanti per \sim 20 minuti.

La figura 1 presenta un'immagine di gel di agarosio che mostra i profili di bande indicativi di un individuo di sesso maschile e uno di sesso femminile.

Figura 1: Immagine in gel di agarosio che mostra il profilo di banda indicativo di un individuo di sesso maschile (σ) (una banda a \sim 203 bp: DMRT1) e di un individuo di sesso femminile (ρ) (due bande a \sim 259 bp: DM-W e 203 bp:DMRT1).



BIBLIOGRAFIA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

Appendice 6

MISURAZIONE DELLA VITELLOGENINA

La misurazione della vitellogenina (VTG) è effettuata mediante una prova di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), originariamente elaborato per la VTG dei ciprinidi (Parks *et al.*, 1999). Attualmente non esistono anticorpi in commercio per *X. laevis*. Tuttavia, data l'abbondanza di informazioni relative a questa proteina e la disponibilità di servizi commerciali di produzione di anticorpi con un buon rapporto costo/qualità, è ragionevole supporre che i laboratori possano sviluppare facilmente un test ELISA per effettuare questa misurazione (Olmstead *et al.*, 2009). Anche Olmstead *et al.* (2009) forniscono una descrizione della prova, modificata per la VTG di *X. tropicalis*, come indicato di seguito. Il metodo utilizza un anticorpo prodotto in reazione alla VTG di *X. tropicalis*, ma è noto che esso funziona anche per la VTG della specie *X. laevis*. Giova osservare che possono essere utilizzati anche test ELISA non competitivi e che questi possono avere limiti di rilevamento inferiori rispetto al metodo descritto di seguito.

Materiali e reagenti

- Siero contenente l'anticorpo primario preassorbito

Mescolare 1 parte di siero contenente l'anticorpo primario anti-VTG della *X. tropicalis* con 2 parti di plasma di maschio prelevato dal gruppo di controllo e lasciar riposare a temperatura ambiente per ~ 75 minuti, porre in ghiaccio per 30 min, centrifugare a $> 20K \times G$ per 1 ora a 4 °C, eliminare il supernatante, aliquotare, conservare a -20 °C.

- Anticorpo secondario

Coniugato IgG di capra anti-coniglio / HRP (ad es., Bio-Rad 172 -1019)

- Standard di VTG

VTG purificata di *X. laevis* a 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3', 5,5' tetrametil benzidina) (ad es., KPL 50-76-00; o Sigma T0440)
- Siero di capra (NGS)(e.g., Chemicon® S26-100ml)
- piastre da microtitolazione a 96 pozzetti in polistirene EIA (ad es., ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- Forno di ibridazione a 37 °C (o incubatore ad aria a rapido riequilibrio) per piastre, bagnomaria per provette
- Altre attrezzature, sostanze chimiche e materiali comunemente utilizzati in laboratorio.

Ricette

Tampone di rivestimento (50 mM di tampone carbonato, pH 9.6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
Acqua	428 ml

PBS 10X (0,1 M di fosfato, 1,5 M di NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
Acqua	810 ml

Tampone di lavaggio (PBST):

PBS 10X	100 ml
Acqua	900 ml

Regolare il pH a 7,3 con 1 M di HCl, poi aggiungere 0,5 ml di Tween-20

Tampone di prova:

Siero di capra (NGS)	3,75 ml
Tampone di lavaggio:	146,25 ml

Prelievo dei campioni

Il sangue è raccolto mediante un tubo capillare per ematocrito eparinato e riposto nel ghiaccio. Dopo centrifugazione per 3 minuti, il tubo è etichettato, aperto e il plasma espulso in provette da microcentrifuga da 0,6 ml contenenti 0,13 unità di aprotinina liofilizzata. (Queste provette sono preparate in anticipo mediante aggiunta della quantità adeguata di aprotinina, congelamento e liofilizzazione in una centrifuga sotto vuoto a bassa temperatura fino ad essiccamento). Conservare il plasma a -80 °C fino all'analisi.

Procedura per una piastra

Rivestimento della piastra

Mescolare 20 µl di VTG purificata con 22 ml di tampone carbonato (3 µg/ml). Versare 200 µl della miscela in ciascun pozzetto di una piastra a 96 pozzetti. Ricoprire la piastra con pellicola sigillante adesiva e lasciar incubare a temperatura di 37 °C per 2 ore (o 4 °C per una notte).

Bloccare la piastra

La soluzione bloccante è preparata aggiungendo 2 ml di siero di capra (NGS) a 38 ml di tampone carbonato. Rimuovere la soluzione bloccante e asciugare agitando. Aggiungere 350 µl di soluzione bloccante in ciascun pozzetto. Ricoprire con pellicola sigillante adesiva e incubare a temperatura di 37 °C per 2 ore (o 4 °C per una notte).

Preparazione degli standard

Mescolare 5,8 µl di standard di VTG purificata con 1,5 ml di tampone di prova in una provetta di vetro monouso borosilicato (12 x 75 mm). Ciò consente di ottenere 12 760 ng/ml di soluzione. Preparare quindi una diluizione in serie aggiungendo 750 µl della diluizione precedente a 750 µl del tampone di prova per ottenere le concentrazioni finali di 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 e 50 ng/ml.

Preparazione dei campioni

Iniziare con una diluizione 1:300 (ad esempio, mescolare 1 µl di plasma con 299 µl di tampone di prova) o una diluizione 1:30 del plasma nel tampone di prova. Se si vogliono ottenere grandi quantità di VTG, possono essere necessarie diluizioni aggiuntive o maggiori. Cercare di mantenere il valore B/B₀ entro l'intervallo degli standard. Per i campioni senza VTG apprezzabile, ad esempio maschi e femmine di controllo (che sono tutti immaturi), utilizzare la diluizione 1:30. I campioni meno diluiti possono indurre effetti di matrice indesiderati.

Si raccomanda inoltre di analizzare un campione di controllo positivo su ciascuna piastra. Tale controllo proviene da un pool di plasma contenente elevati livelli indotti di VTG. Il pool è inizialmente diluito in NGS, suddiviso in aliquote e conservato a -80 °C. Per ciascuna piastra, viene scongelata un' aliquota, ulteriormente diluita in tampone di prova ed analizzata come un campione di prova.

Incubazione con l'anticorpo primario

Preparare l'anticorpo primario diluendo 1:2000 del siero contenente l'anticorpo primario preassorbito nel tampone di prova (ad esempio, 8 µl - 16 ml di tampone di prova). Combinare 300 µl di soluzione contenente l'anticorpo primario con 300 µl di campione/standard in una provetta di vetro. Preparare la provetta di B₀ seguendo la medesima procedura con 300 µl di tampone di prova e 300 µl di anticorpo. Inoltre, preparare una provetta NSB contenente unicamente 600 µl di tampone di prova (cioè senza anticorpi). Ricoprire le provette con Parafilm e agitare delicatamente nell'agitatore. Mantenere in incubazione a 37 °C in bagnomaria per 1 ora.

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra appena prima del completamento dell'incubazione dell'anticorpo primario. A tal fine, scuotere la piastra per farne uscire il contenuto e asciugarla con carta assorbente. Poi riempire i pozzetti con 350 μ l di soluzione di lavaggio, svuotare e asciugare tamponando. In questo caso sono utili una pipetta a ripetizione multicanale o un lavatore per micropiastre. La fase di lavaggio è ripetuta altre due volte per un totale di tre lavaggi.

Caricamento della piastra

Una volta lavata la piastra, estrarre le provette dal bagnomaria e agitare leggermente nell'agitatore. Aggiungere 200 μ l da ciascuna provetta di campione, di standard, di B_0 e di NSB per raddoppiare i pozzetti della piastra. Ricoprire la piastra con pellicola sigillante adesiva e lasciar incubare a temperatura di 37 °C per 1 ora.

Incubazione con l'anticorpo secondario

Al termine dell'incubazione della fase precedente, le piastre vanno nuovamente lavate tre volte, come sopra indicato. Preparare l'anticorpo secondario diluito mescolando 2,5 μ l dell'anticorpo secondario con 50 ml di tampone di prova. Aggiungere 200 μ l dell'anticorpo secondario diluito in ciascun pozzetto, sigillare come sopra indicato, e incubare per 1 ora alla temperatura di 37 °C.

Aggiunta di un substrato

Quando l'incubazione dell'anticorpo secondario è completata, lavare la piastra tre volte come descritto in precedenza. Successivamente, aggiungere 100 μ l di substrato TMB in ciascun pozzetto. Lasciar reagire per 10 minuti, preferibilmente al riparo da fonti di luce brillante. Arrestare la reazione aggiungendo 100 μ l di acido fosforico 1 M. Ciò modificherà il colore da blu a giallo intenso. Misurare l'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre.

Calcolare B/B₀

Sottrarre il valore medio NSB da tutte le misurazioni; il valore B/B₀ di ciascun campione e standard è calcolato dividendo il valore di assorbanza (B) per l'assorbanza media del campione B₀.

Generare una curva standard e determinare le quantità sconosciute

Generare una curva standard con l'ausilio di un software di grafica (ad esempio SlidewriteTM o Sigma Plot[®]) che estrapolerà la quantità dalla B/B₀ del campione sulla base della B/B₀ delle soluzioni standard. Tipicamente, la quantità è rappresentata su una scala logaritmica e la curva è di forma sigmoide, che, tuttavia, può apparire lineare quando l'intervallo di standard utilizzato è ristretto. Correggere le quantità del campione per il fattore di diluizione e annotare in mg di VTG/ml di plasma.

Determinare i limiti minimi di rilevazione

Spesso, soprattutto negli esemplari maschi normali, non sarà chiaro come annotare i risultati ottenuti dai valori bassi. In questi casi, si utilizza un intervallo di confidenza al 95 % per determinare se il valore debba essere indicato come "zero" o un altro numero. Se il risultato del campione corrisponde all'intervallo di confidenza dello standard zero (B_0), il risultato deve essere registrato come zero. Il livello minimo di rilevazione sarà il livello più basso che è sistematicamente diverso dallo standard zero; ciò significa che i due intervalli di confidenza non si sovrappongono. Se il risultato di campionamento si situa all'interno o al di sopra del limite di confidenza del livello minimo di rilevazione, si registrerà il valore calcolato. Se un campione è compreso tra lo standard zero e gli intervalli dei limiti minimi di rilevazione, si annota una metà del livello minimo di rilevazione per il valore di tale campione.

BIBLIOGRAFIA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

Appendice 7

ANALISI STATISTICA

Il LAGDA genera tre tipologie di dati che vanno analizzati statisticamente: 1) dati quantitativi continui; 2) dati relativi ai tempi che precedono le varie manifestazioni concernenti i ritmi di sviluppo (giorni fino al raggiungimento dello stadio NF62); e 3) dati ordinali sotto forma di indici di gravità relativi o di stadi di sviluppo, derivanti da valutazioni istopatologiche. L'albero decisionale raccomandato per l'analisi statistica per il LAGDA è illustrato nella figura 1. Di seguito sono riportate anche alcune annotazioni che potrebbero essere utili per effettuare tale analisi. Con riferimento all'albero decisionale, i valori ottenuti per la mortalità, la crescita (peso e lunghezza) e l'indice epatosomatico (LSI) devono essere analizzati conformemente al ramo «Altri endpoint».

Dati continui

Innanzitutto, si verifica se i dati per gli endpoint continui sono monotoni mediante trasformazione di rango dei dati, l'approssimazione a un modello ANOVA e il raffronto dei contrasti lineari e quadratici. Se i dati sono monotoni, occorre applicare un test di tendenza regressivo di Jonckheere-Terpstra alle mediane delle repliche senza effettuare alcun'altra analisi successiva. Un'alternativa per i dati normalmente distribuiti con varianze omogenee è il test regressivo di Williams. Se non sono monotoni (il contrasto quadrato è significativo e il contrasto lineare è non significativo), i dati devono essere analizzati utilizzando un modello ANOVA a effetti misti. I dati devono quindi essere valutati per verificare la normalità (preferibilmente con il test di Shapiro-Wilk o di Anderson-Darling) e l'omogeneità della varianza (preferibilmente con il test di Levene). Entrambi i test utilizzano i dati residui di un modello ANOVA a effetti misti. È possibile sostituire, previo giudizio di un esperto, tali test formali di normalità e omogeneità della varianza, ma questi ultimi sono comunque preferibili. Se i dati presentano una distribuzione normale e una varianza omogenea, i presupposti di un modello ANOVA a effetti misti sono soddisfatti e il test di Dunnett permette di determinare gli effetti significativi del trattamento. In caso di «non normalità» o di «eterogeneità della varianza» le ipotesi del test di Dunnett sono violate e si cerca di trasformare i dati per ottenerne la distribuzione normale e di stabilizzare la varianza. Se non si trova alcuna trasformazione di questo tipo, si determinano gli effetti significativi del trattamento con il test di Dunn. Se possibile, è opportuno effettuare un test unilaterale anziché bilaterale, ma è necessario il giudizio di un esperto per determinare quale test sia adeguato per un determinato endpoint.

Mortalità

I dati sulla mortalità dovrebbero essere analizzati per il periodo di tempo che comprende l'intera prova e dovrebbero essere espressi in percentuale dei decessi in una determinata vasca. I girini che non hanno completato la metamorfosi in un determinato periodo di tempo, i girini che fanno parte della coorte di sottocampioni di larve, le rane giovani che sono soppresses e tutti gli altri animali morti per errore sperimentale sono trattati come dati

censurati e non inclusi nel denominatore del rapporto per il calcolo del valore percentuale. Prima di qualsiasi analisi statistica le proporzioni di mortalità sono trasformate per la radice quadrata dell'arcoseno. In alternativa si può utilizzare il test regressivo di Cochran-Armitage, eventualmente con correzione di tipo Rao-Scott in presenza di dispersione eccessiva.

Peso e lunghezza (dati relativi alla crescita)

I maschi e le femmine non sono dimorfici sessualmente durante la metamorfosi, pertanto i dati relativi alla crescita del sottocampione di larve dovrebbero essere analizzati indipendentemente dal sesso. Tuttavia, i dati relativi alla crescita delle rane allo stadio giovanile dovrebbero essere analizzati separatamente in funzione del sesso genetico. Può essere necessaria una trasformazione logaritmica per questi endpoint, in quanto non è raro che i dati relativi alla dimensione seguano una legge log-normale.

Indice epatosomatico (LSI)

I pesi del fegato devono essere normalizzati in funzione del peso del corpo intero (cioè, LSI) e analizzati separatamente in funzione del sesso genetico.

Tempo fino allo stadio NF62

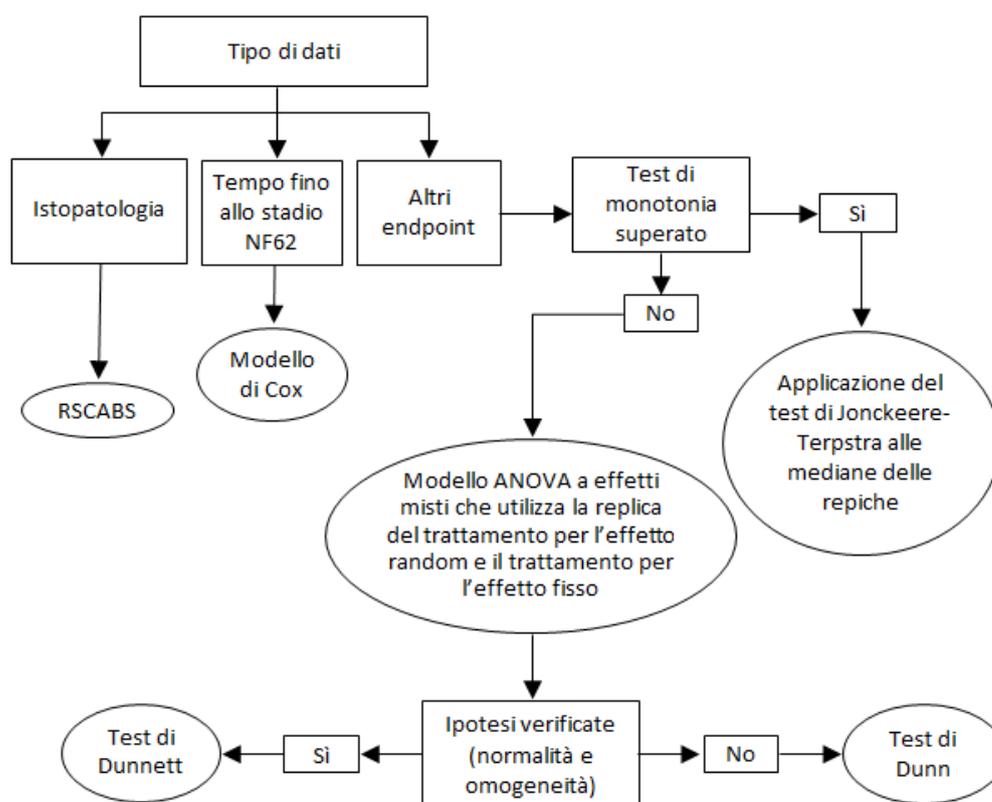
I dati relativi al tempo trascorso fino alla metamorfosi sono trattati come dati di tipo "time-to-event"; i decessi o individui che non raggiungono lo stadio NF62 in 70 giorni sono trattati come dati censurati a destra (ossia, il valore reale è superiore a 70 giorni, ma lo studio termina prima che gli animali abbiano raggiunto lo stadio NF62 in 70 giorni). Il tempo mediano fino allo stadio NF62, che corrisponde al completamento della metamorfosi, in controlli contenenti acqua di diluizione è utilizzato per determinare la data del completamento della prova. Il tempo mediano fino al completamento della metamorfosi potrebbe essere determinato mediante stimatori del prodotto-limite di Kaplan-Meier. Questo endpoint dovrebbe essere analizzato utilizzando un modello a effetti misti a rischi proporzionati di Cox, che tiene conto della struttura delle repliche dello studio.

Dati istopatologici (indice di gravità e fasi di sviluppo)

I dati istopatologici sono costituiti da indici di gravità o fasi di sviluppo. Una prova denominata RSCABS (*Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) utilizza un test di tendenza Cochran-Armitage con correzione di Rao-Scott per ciascun livello di gravità in una risposta istopatologica (Green *et al.*, 2014). La correzione di tipo Rao-Scott permette di tenere conto del disegno sperimentale delle vasche di replica nella prova. La procedura RSCABS «*by Slices*» (per tranches) tiene conto dell'aspettativa biologica secondo la quale la gravità dell'effetto tende ad aumentare con l'aumento delle dosi o delle concentrazioni, pur conservando gli indici individuali e indicando la gravità di qualsiasi effetto riscontrato. La procedura RSCABS non si limita a determinare quali trattamenti sono statisticamente diversi dai controlli (ossia, presentano una patologia più grave rispetto ai controlli), ma permette di determinare anche a quale indice di gravità tale effetto appare, e quindi di

collocare l'analisi in un contesto fortemente necessario. Per determinare gli stadi di sviluppo delle gonadi e dei dotti riproduttivi, occorre sottoporre i dati a un'ulteriore manipolazione, in quanto un'ipotesi del test RSCABS è che la gravità degli effetti aumenta con la dose. L'effetto osservato potrebbe corrispondere a un ritardo o un'accelerazione dello sviluppo. È pertanto opportuno analizzare i dati sugli stadi di sviluppo come indicato al fine di individuare un'accelerazione nello sviluppo e quindi invertirli manualmente prima di effettuare una seconda analisi per individuare un eventuale ritardo nello sviluppo.

Figura 1: Albero decisionale per l'analisi statistica dei dati del LAGDA.



BIBLIOGRAFIA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, 1108-1116.

Appendice 8

CONSIDERAZIONI DI CUI TENER CONTO PER MONITORARE E RIDURRE AL MINIMO LA FREQUENZA DELLA SCOLIOSI

La scoliosi idiopatica, che di solito si manifesta come una «coda piegata» nei girini della specie *Xenopus laevis*, può complicare le osservazioni morfologiche e comportamentali nelle popolazioni di prova. Occorre adoperarsi per ridurre al minimo o eliminare l'incidenza della scoliosi, sia negli animali che nelle condizioni sperimentali. Nella prova definitiva si raccomanda che l'incidenza della scoliosi moderata e grave sia inferiore al 10 %, per aumentare la fiducia nella capacità della prova di individuare gli effetti sullo sviluppo correlati al trattamento in larve di anfibi altrimenti in buona salute.

Le osservazioni giornaliere durante la prova definitiva devono registrare sia l'incidenza (conteggio individuale) sia la gravità della scoliosi, se presente. La natura dell'anomalia va descritta con riferimento alla localizzazione (ad esempio, anteriore o posteriore alla cloaca) e la direzione della curvatura (ad esempio, laterale o dorso-ventrale). La gravità può essere classificata come segue:

(NR) Non significativa: nessuna curvatura presente

(1) Minima: leggera curvatura laterale posteriore alla cloaca; apparente solo a riposo

(2) Moderata: curvatura laterale posteriore alla cloaca; visibile in qualsiasi momento ma non inibisce il movimento

(3) Grave: curvatura laterale anteriore alla cloaca; OPPURE qualsiasi curvatura che impedisca il movimento; OPPURE qualsiasi curvatura dorso-ventrale

Un gruppo consultivo scientifico dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (US EPA) per le norme FIFRA (FIFRA SAP 2013) ha esaminato i dati sintetici relativi alla scoliosi nell'ambito di quindici saggi di metamorfosi degli anfibi sulla specie *X. laevis* (stadi 51-60+) e ha formulato raccomandazioni generali per ridurre la prevalenza di questa anomalia nelle popolazioni sperimentali. Le raccomandazioni sono pertinenti per il LAGDA, anche se questa prova implica un calendario di sviluppo più lungo.

Dati storici relativi alla deposizione delle uova

In generale, adulti sani e di qualità superiore dovrebbero essere utilizzati come coppie riproduttrici; l'eliminazione di coppie riproduttrici che generano prole con scoliosi può ridurre al minimo l'apparizione di tale patologia nel corso del tempo. In particolare, può essere utile ridurre al minimo il ricorso a riproduttori catturati allo stato selvatico. Il periodo di esposizione del LAGDA inizia con gli embrioni dello stadio NF8-10 e non è possibile determinare all'inizio della prova se determinati individui manifesteranno una scoliosi. Pertanto, oltre al monitoraggio dell'incidenza della scoliosi negli animali sottoposti a prova,

è opportuno documentare i dati storici relativi alla deposizione delle uova (compresa la prevalenza della scoliosi nelle larve autorizzate a svilupparsi). Può essere utile monitorare ulteriormente la porzione delle uova deposte non utilizzata in un determinato studio e rendere conto di tali osservazioni (FIFRA SAP 2013).

Qualità dell'acqua

È importante garantire un'adeguata qualità dell'acqua, sia nello stock di laboratorio che durante la prova. Oltre ai criteri di qualità dell'acqua periodicamente valutata ai fini della tossicità, può essere utile monitorare le eventuali carenze nutrizionali e correggerle (e.g., carenza di vitamina C, calcio, fosforo) o livelli eccessi di selenio e rame, che sono indicati come elementi che possono indurre la scoliosi a livelli variabili nelle specie *Rana* e *Xenopus* allevate in laboratorio. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; come indicato in FIFRA SAP 2013). L'applicazione di un regime alimentare adeguato (cfr. appendice 4) e la pulizia regolare delle vasche migliorano in generale la qualità dell'acqua e la salute degli organismi sperimentali.

Alimentazione

Le raccomandazioni specifiche in materia di regime alimentare, risultate efficaci nel LAGDA, sono descritte in dettaglio nell'appendice 4. Si raccomanda di controllare la presenza, nelle fonti dei mangimi, di tossine biologiche, erbicidi e altri pesticidi che sono notoriamente causa di scoliosi in *X. laevis* o altri animali acquatici (Schlenk e Jenkins 2013). Ad esempio, l'esposizione ad alcuni inibitori della colinesterasi è stata associata alla scoliosi nei pesci (Schultz *et al.* 1985) e nelle rane (Bacchetta *et al.* 2008).

BIBLIOGRAFIA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 — 118

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraéz, and P. Herraéz. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezii* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC. "