

ALLEGATO 2B

«B.1 bis. TOSSICITÀ ORALE ACUTA – METODO A DOSE FISSA

1. METODO

Questo metodo di prova è equivalente al metodo OCSE TG 420 (2001).

1.1 INTRODUZIONE

I metodi tradizionali di valutazione della tossicità acuta utilizzano come *endpoint* la morte degli animali. Nel 1984, la *British Toxicology Society* ha proposto un nuovo metodo, basato sulla somministrazione di una serie di dosi fisse (1), che invece di utilizzare come *endpoint* la morte degli animali prevede l'osservazione di segni evidenti di tossicità in seguito alla somministrazione di una dose facente parte di una serie prestabilita. In seguito a studi di validazione *in vivo* eseguiti nel Regno Unito (2) e a livello internazionale (3), il procedimento è stata adottato come metodo di prova nel 1992. Successivamente, le proprietà statistiche del metodo a dose fissa sono state oggetto di valutazione in una serie di studi basati sull'impiego di modelli matematici (4)(5)(6). Sia gli studi *in vivo* sia quelli di modellizzazione hanno dimostrato che il procedimento è riproducibile, utilizza un minor numero di animali provocando meno sofferenze rispetto ai metodi tradizionali, e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di prova della tossicità acuta.

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per un determinato scopo, si rimanda alle linee guida OCSE sui test di tossicità orale acuta (7), che contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione e sull'interpretazione del metodo di prova B.1bis.

Il metodo prevede che nello studio principale si utilizzino solo dosi a moderata tossicità, evitando di somministrare dosi che possano avere un effetto letale. Inoltre non è necessario somministrare dosi che provochino notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto dell'azione corrosiva o fortemente irritante. Gli animali moribondi o che manifestano dolore evidente o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e ai fini dell'interpretazione dei risultati devono essere assimilati agli animali morti durante lo svolgimento del test. I criteri da applicare per decidere la soppressione degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di specifiche linee guida, che indicano anche come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (8).

Il metodo fornisce informazioni sulla pericolosità della sostanza esaminata, permettendone la classificazione secondo il GHS (*Global Harmonized System*), sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (9).

Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza, i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini, l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza del test per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

1.2 DEFINIZIONI

**Tossicità orale acuta:** effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose o di più dosi di una sostanza nell'arco di 24 ore.

**Morte tardiva:** termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente, durante il periodo di osservazione di 14 giorni.

**Dose:** quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale sottoposto al test (ad es. mg/kg).

**Tossicità manifesta:** termine generale che indica la presenza di chiari segni di tossicità in seguito alla somministrazione della sostanza di prova [per alcuni esempi, cfr. (3)], tali da far prevedere alla dose fissa immediatamente superiori manifestazioni di dolore intenso e segni persistenti di grave sofferenza, uno stato di agonia [i criteri che definiscono tale stato sono illustrati nelle linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)] o la morte della maggior parte degli animali.

**GHS (Globally Harmonized System):** sistema armonizzato globale per la classificazione delle sostanze e delle miscele chimiche. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute umana e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle merci pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'Organizzazione internazionale del lavoro (comunicazione del rischio), coordinata dal programma IOMC per la gestione ottimale delle sostanze chimiche (*Inter-organization programme for the sound management of chemicals*).

**Morte imminente:** stato in cui si prevede l'agonia o la morte dell'animale prima della successiva osservazione in programma. Per i roditori tra i segni indicativi di morte imminente figurano le convulsioni, la posizione laterale o prona e il tremore [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

**DL<sub>50</sub> (dose letale 50):** la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, capace di provocare la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL<sub>50</sub> viene espresso in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

**Dose limite:** dose corrispondente al limite superiore fissato per il test (2 000 o 5 000 mg/kg).

**Stato di agonia:** fase in cui l'animale è moribondo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

**Morte prevedibile:** presenza di segni clinici, come ad esempio l'incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

### 1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

La sostanza viene somministrata a gruppi di animali dello stesso sesso seguendo un procedimento articolato in più fasi successive che prevede la somministrazione di dosi fisse di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg (in casi eccezionali può essere prevista una dose fissa aggiuntiva di 5 000 mg/kg; cfr. punto 1.6.2). Il livello di dose iniziale è scelto sulla base di uno studio di osservazione, ed è la dose alla quale si prevede che si manifestino alcuni segni di tossicità, senza tuttavia causare effetti tossici gravi o la morte degli animali. I segni clinici e le condizioni associate a dolore, sofferenza e morte imminente sono descritti in apposite linee guida OCSE (8). A seconda della presenza o dell'assenza di segni di tossicità o mortalità, la sostanza in esame può essere somministrata ad altri gruppi di animali a dosi superiori o inferiori. La procedura prosegue fino a quando viene identificata la dose che causa tossicità manifesta o la morte di un solo animale o fino alla somministrazione della dose più elevata, se non vengono riscontrati effetti, mentre viene immediatamente interrotta se si verificano decessi alla dose più bassa.

### 1.4 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

#### 1.4.1 Scelta delle specie animale

È preferibile utilizzare il ratto, ma è possibile ricorrere anche ad altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (7), perché la letteratura esistente sui test convenzionali DL<sub>50</sub> indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (10). Tuttavia se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche strutturalmente affini indicano la probabilità che i maschi siano più sensibili delle femmine, si devono utilizzare animali di sesso maschile. In quest'ultimo caso, occorre fornire un'adeguata giustificazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani, appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. All'inizio del trattamento ciascun animale deve avere un'età compresa tra 8 e 12 settimane ed un peso compreso tra l'80 ed il 120 % del peso medio degli animali a cui è già stata somministrata la sostanza.

#### 1.4.2 Condizioni di stabulazione e di alimentazione

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, alternando 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua *ad libitum*. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose somministrata, ma il numero di animali per gabbia non deve impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

1.4.3 **Preparazione degli animali**

Gli animali sono scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 **Preparazione delle dosi**

In genere la sostanza di prova va somministrata a volume costante per tutte le dosi, variando la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il test viene eseguito su prodotti o miscele allo stato liquido, ai fini della valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; alcune autorità di regolamentazione impongono obbligatoriamente l'uso della sostanza non diluita. In ogni caso, non deve essere superato il volume massimo della dose somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale, e nei roditori non deve di norma superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa, seguita in ordine di preferenza da una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) e infine da una soluzione in altri veicoli. Per i veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e ritenuta accettabile.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza da esaminare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o apposita cannula per intubazione. Nel remoto caso in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, quest'ultima può essere frazionata e somministrata in un arco di tempo non superiore a 24 ore.

Prima della somministrazione della sostanza gli animali devono essere tenuti a digiuno (ad esempio, l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente per i ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, l'alimentazione può essere sospesa per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, a seconda della durata del periodo di somministrazione può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali.

1.5.2 **Studio di osservazione**

Lo scopo dello studio di osservazione è di consentire la scelta della giusta dose iniziale per lo studio principale. La sostanza in esame viene somministrata in maniera sequenziale a singoli animali, secondo il diagramma di flusso riportato all'allegato 1. Lo studio di osservazione si conclude quando è possibile decidere la dose iniziale da utilizzare nello studio principale (o se la dose fissa più bassa provoca la morte di un animale).

La dose iniziale da utilizzare nello studio di osservazione, scelta tra i livelli di dose fissi di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg, è la dose che si prevede possa provocare tossicità manifesta sulla base, ove possibile, di dati *in vivo* e *in vitro* relativi alla stessa sostanza chimica e a sostanze di struttura affine. In mancanza di questi dati, si utilizza una dose iniziale di 300 mg/kg.

Tra le somministrazioni a ciascun animale devono trascorrere almeno 24 ore. Tutti gli animali devono essere tenuti in osservazione per almeno 14 giorni.

In casi eccezionali, e solo se giustificato da specifiche esigenze normative, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso pari a 5 000 mg/kg (cfr. allegato 3). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alla dose stabilita per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di questa dose va preso in considerazione solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute umana o animale o per la protezione dell'ambiente.

Se la somministrazione della dose fissa più bassa (5 mg/kg) provoca la morte dell'animale nel corso dello studio di osservazione, la procedura normale prevede l'interruzione dello studio e l'assegnazione della sostanza alla categoria GHS 1 (cfr. allegato 1). Tuttavia, qualora sia necessaria un'ulteriore conferma della classificazione, può essere utilizzata la seguente procedura supplementare facoltativa: la sostanza viene somministrata a un secondo animale alla dose di 5 mg/kg; se questo secondo animale muore, viene confermata la classificazione nella categoria GHS 1 e lo studio viene immediatamente interrotto; se invece sopravvive, la sostanza viene somministrata alla dose di 5 mg/kg a non più di altri tre animali. A causa dell'elevato rischio di mortalità, per proteggere gli animali la sostanza esaminata deve essere somministrata in

maniera sequenziale. L'intervallo di tempo tra le somministrazioni ai diversi animali deve essere sufficiente ad accertare che l'animale trattato in precedenza riesca a sopravvivere. Se si verifica un secondo decesso, la sequenza deve essere immediatamente interrotta e la sostanza non deve essere somministrata ad altri animali. Dal momento che il verificarsi di un secondo decesso (indipendentemente dal numero di animali a cui è già stata somministrata la sostanza al momento dell'interruzione) rientra nel risultato A (2 o più decessi), si applica la regola di classificazione di cui all'allegato 2 alla dose fissa di 5 mg/kg (categoria 1 se vi sono 2 o più morti o categoria 2 se c'è un'unica morte). L'allegato 4 riporta la classificazione prevista dal sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

1.5.3 **Studio principale**

1.5.3.1 *Numero di animali e livelli di dose*

I diagrammi di flusso di cui all'allegato 2 illustrano le tappe da seguire dopo la somministrazione del livello di dose iniziale. Vi sono tre possibilità: interrompere il test e assegnare la sostanza alla classe di rischio appropriata; effettuare il test a una dose fissa superiore; effettuare il test a una dose fissa inferiore. Tuttavia, per salvaguardare gli animali, se un livello di dose ha causato la morte di un animale durante lo studio di osservazione, questo livello non deve più essere utilizzato nello studio principale (cfr. allegato 2). L'esperienza indica che dopo la somministrazione del livello di dose iniziale in genere è possibile classificare la sostanza senza bisogno di effettuare ulteriori test.

Per ciascun livello di dose, normalmente si usano in tutto cinque animali dello stesso sesso: l'animale a cui nello studio di osservazione è stato somministrato lo stesso livello di dose, più altri quattro animali (tranne nel caso remoto in cui un livello di dose utilizzato nello studio principale non sia stato incluso nello studio di osservazione).

L'intervallo di tempo tra le somministrazioni dei vari livelli di dose ai diversi animali viene determinato in funzione della comparsa, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere alla somministrazione della dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente. Si consiglia di far trascorrere, se necessario, 3 o 4 giorni tra le somministrazioni per consentire l'osservazione di eventuali segni di tossicità tardiva. L'intervallo di tempo può essere modificato secondo necessità, ad esempio in caso di risposte non convincenti.

Quando si prevede di utilizzare una dose fissa superiore di 5 000 mg/kg, è necessario attenersi alla procedura descritta nell'allegato 3 (cfr. anche punto 1.6.2).

1.5.3.2 *Saggio limite*

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame non è probabilmente tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da test su composti, miscele o prodotti simili, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Se le informazioni sulla tossicità della sostanza sono scarse o nulle o si prevede che la sostanza in esame sia tossica occorre eseguire lo studio principale.

Ai fini delle presenti linee-guida, per il saggio limite si utilizza, seguendo il procedimento normale, una dose iniziale di 2 000 mg/kg (o in casi eccezionali 5 000 mg/kg) nello studio di osservazione, quindi si somministra la stessa dose ad altri quattro animali.

1.6 OSSERVAZIONE

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, prestando particolare attenzione alle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni, a meno che non muoiano o non sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per risparmiare loro sofferenze eccessive. Tuttavia, la durata del periodo di osservazione non è tassativa, ma va stabilita in funzione della natura delle reazioni tossiche, del momento della loro comparsa e dei tempi di recupero e può quindi essere prolungata in caso di necessità. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se questi ultimi tendono ad apparire tardivamente (11). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

Qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità sono necessarie ulteriori osservazioni, che devono riguardare le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nelle linee guida OCSE

citare in bibliografia al punto (8). Gli animali agonizzanti o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, occorre registrare con la massima precisione possibile il momento del decesso.

1.6.1 **Peso corporeo**

I singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza di prova e in seguito almeno una volta alla settimana. Occorre calcolare e registrare le variazioni ponderali. Al termine del test, gli animali sopravvissuti devono essere pesati prima di essere sottoposti a eutanasia.

1.6.2 **Esame patologico**

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del test e quelli che sono ritirati dallo studio per risparmiare loro eccessive sofferenze) devono essere sottoposti a necropsia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, può essere opportuno l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti, che potrebbe fornire indicazioni utili.

2. **DATI**

Occorre fornire risultati individuali per ciascun animale. Tutti i dati devono essere riassunti in una tabella nella quale devono essere indicati per ciascun gruppo sottoposto al test il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il test o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici, il loro decorso e l'eventuale reversibilità e i risultati della necropsia.

3. **PRESENTAZIONE DEI DATI**

3.1 Rapporto di prova

Il rapporto di prova deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza di prova:

- natura fisica, purezza e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione);
- dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se pertinente):

- motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

- specie/ceppo utilizzato;
- condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;
- numero, età e sesso degli animali (compresa l'eventuale giustificazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine);
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

Condizioni del test:

- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza di prova, comprese informazioni sullo stato fisico del preparato somministrato;
- modalità di somministrazione della sostanza di prova, compreso il volume delle dosi e l'orario di somministrazione;
- informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza degli alimenti, provenienza dell'acqua);
- motivazione della scelta della dose iniziale.

Risultati:

- tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);
- tabella del peso corporeo e delle variazioni ponderali;
- peso dei singoli animali nel giorno della somministrazione, e in seguito ad intervalli di una settimana e al momento della morte o del sacrificio;
- data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato;
- momento della comparsa dei segni di tossicità, decorso ed eventuale reversibilità per ciascun animale;
- referto necroscopico e referto istopatologico per ciascun animale, se disponibili.

Discussione e interpretazione dei risultati.

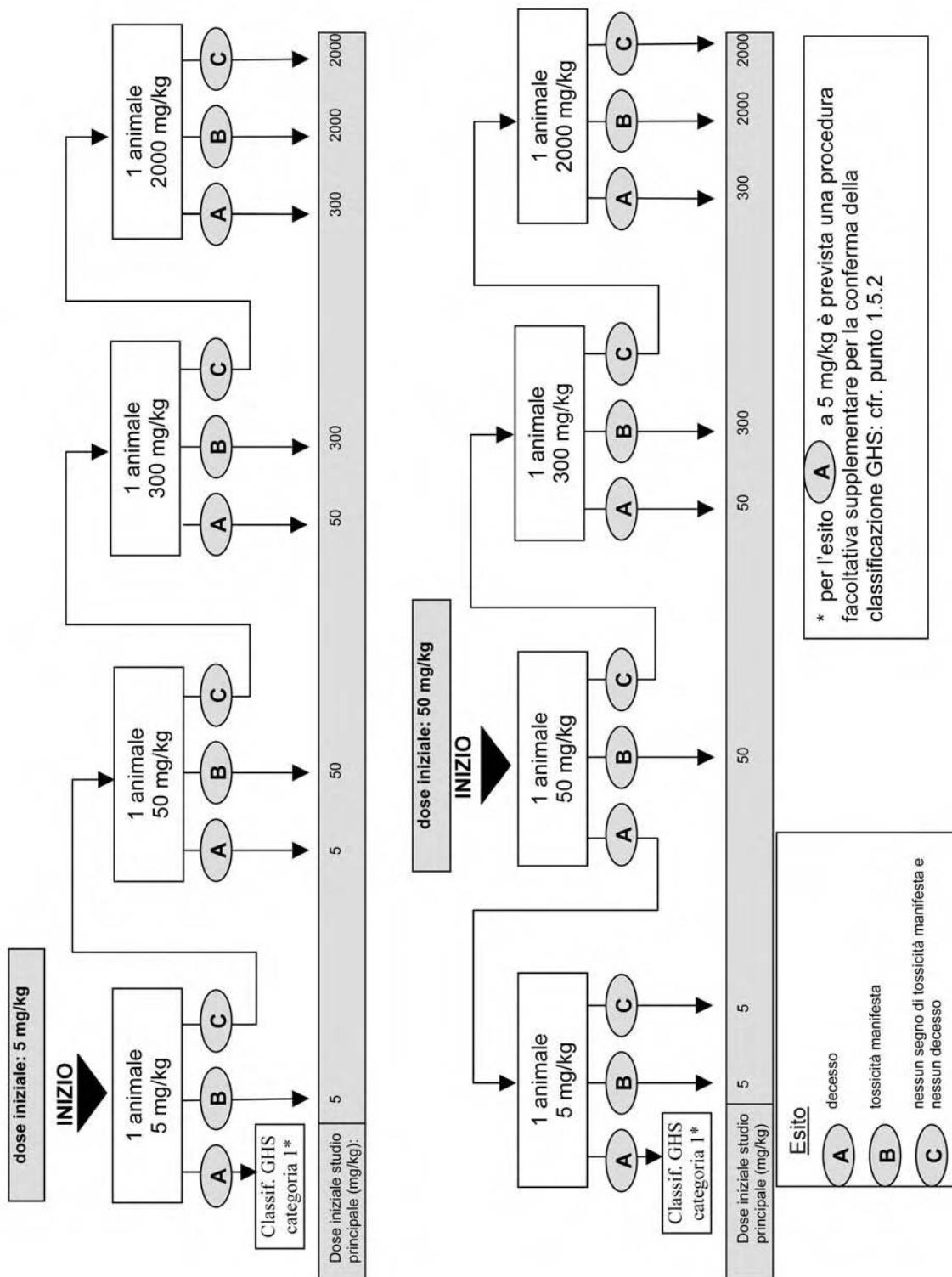
Conclusioni.

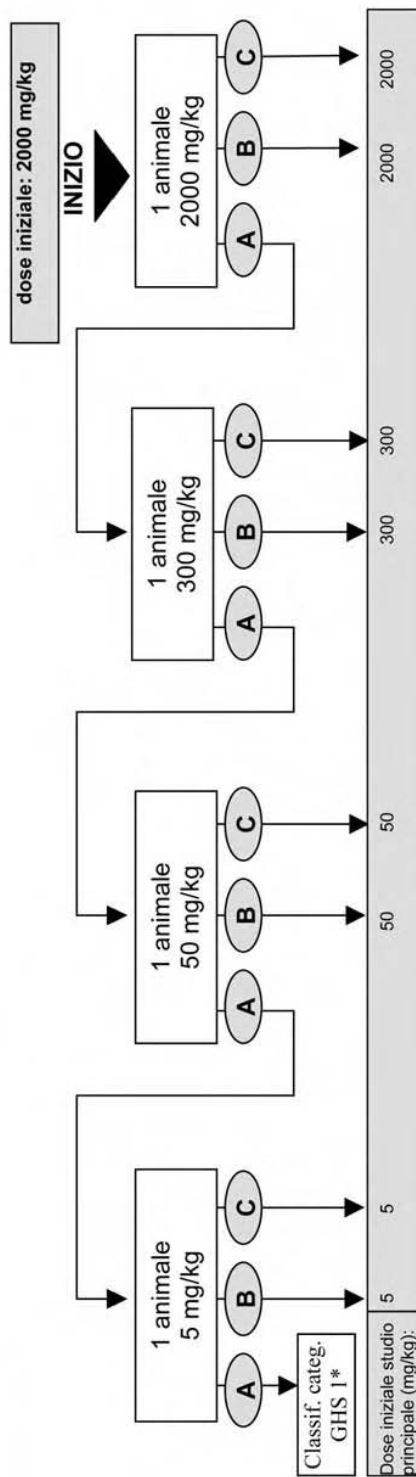
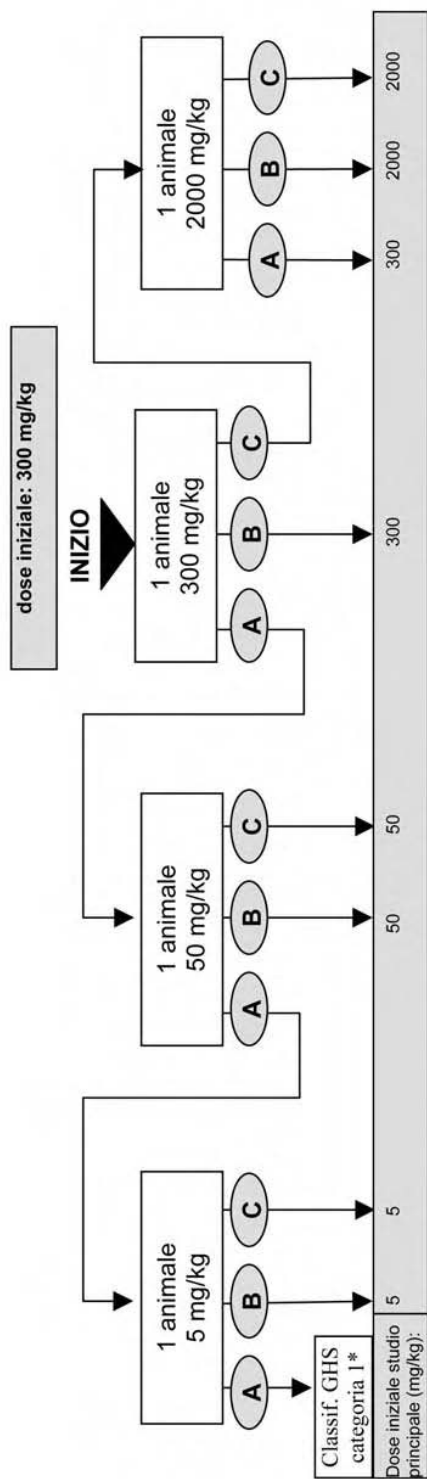
4.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984), *Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity*, Human Toxicol., 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel M.J., Dayan A.D., Shillaker R.O. (1987), *Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity*, Human Toxicol. 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel M.J., Clark D.G., Fielder R.J., Koundakjian P.P., Oliver G.J.A., Pelling D., Tomlinson N.J., Walker A.P. (1990), *The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test*, Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.
- (4) Whitehead A., Curnow R.N. (1992), *Statistical evaluation of the fixed-dose procedure*, Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.
- (5) Stallard N., Whitehead A. (1995), *Reducing numbers in the fixed-dose procedure*, Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). *Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure*. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183-196.
- (7) OECD (2001), *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24, Parigi.
- (8) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.
- (9) OECD (1998), *Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, approvato alla 28ª riunione congiunta del Chemicals Committee e del Working Party on Chemicals nel novembre 1998, parte 2, pag.11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (10) Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I., Goddard M., Segal L., Springer J.A., Myers R.C. (1995), *Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD<sub>50</sub>, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures*, Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.
- (11) Chan P.K., A.W. Hayes (1994), Cap. 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, in A.W. Hayes (a cura di), *Principles and Methods of Toxicology*, terza edizione, Raven Press Ltd., New York, USA.

ALLEGATO 1: DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO DI OSSERVAZIONE





\* per l'esito **A** a 5 mg/kg è prevista una procedura facoltativa supplementare per la conferma della classificazione GHS: cfr. punto 1.5.2.

**Esito**

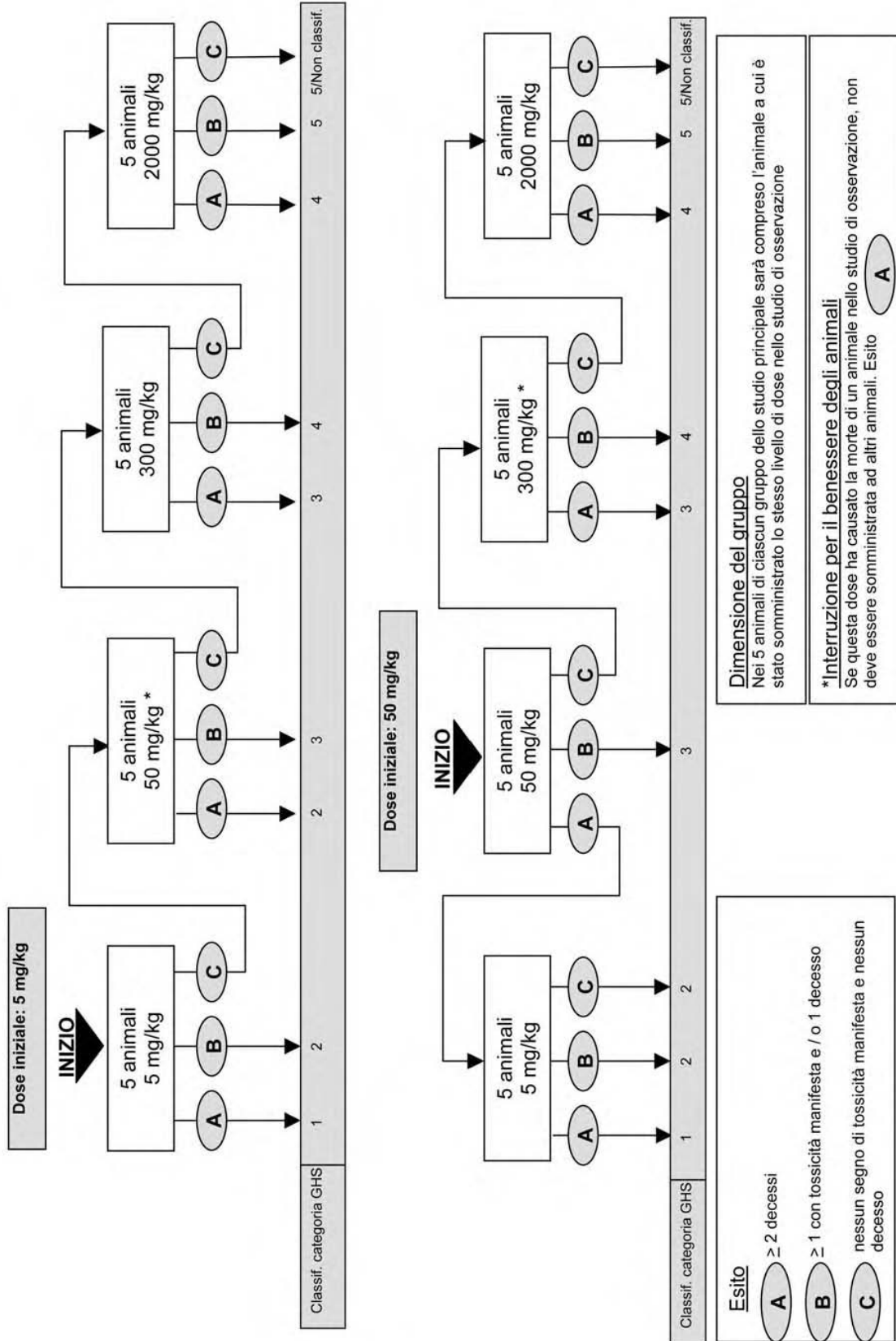
**A** decesso

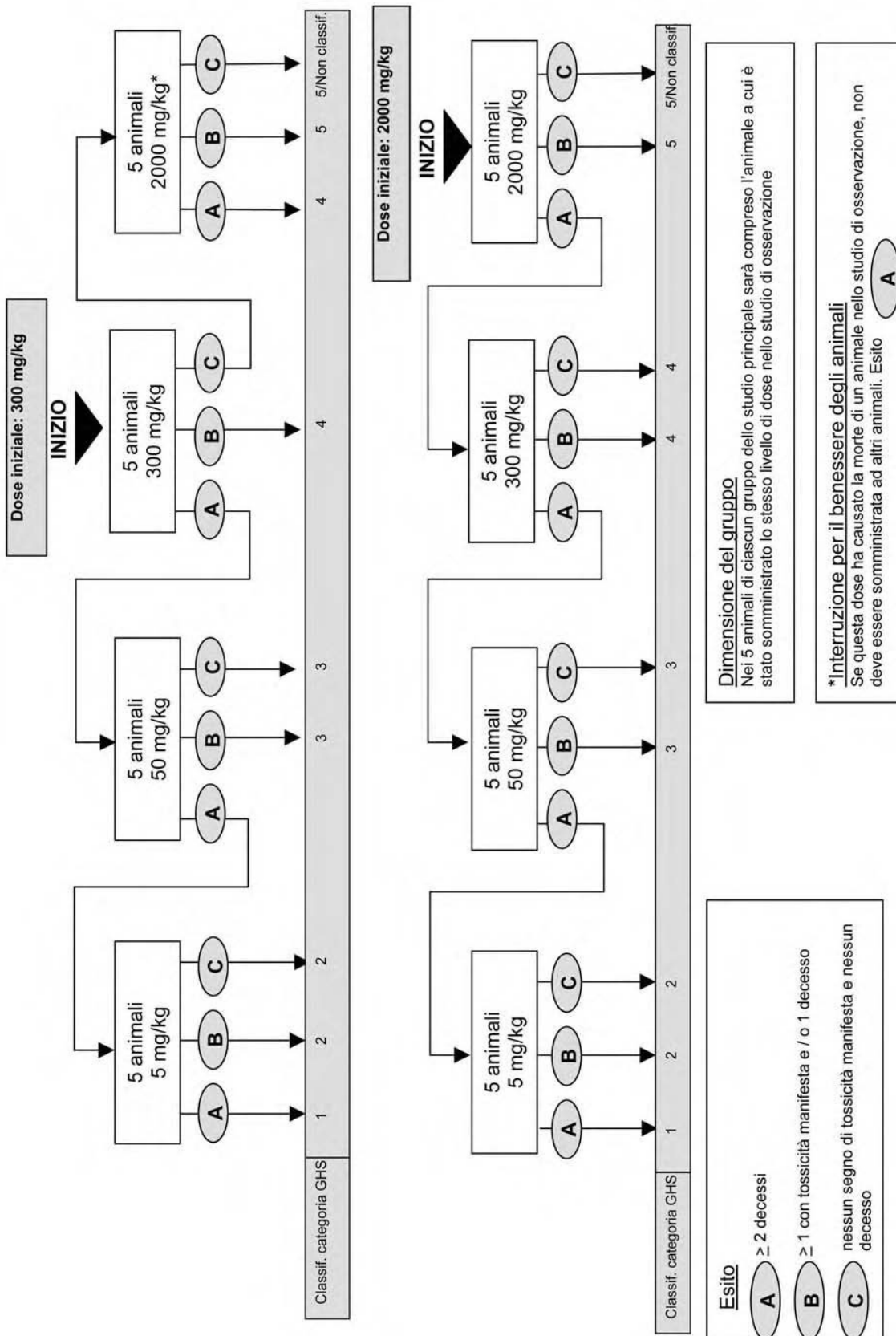
**B** tossicità manifesta

**C** nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso



ALLEGATO 2: DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO PRINCIPALE





ALLEGATO 3

**CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI PREVISTI DI DL<sub>50</sub> SUPERIORI A 2 000 MG/KG PER LE QUALI NON È NECESSARIO ESEGUIRE IL TEST DI TOSSICITÀ**

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 servono a consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che in determinate circostanze possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze per le quali è prevista una DL<sub>50</sub> orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: 2 000 mg/kg < DL<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (categoria 5 nel GHS) nei seguenti casi:

- a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 2 porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;
- b) se sono già disponibili prove attendibili che indicano che la DL<sub>50</sub> si situa nell'intervallo di valori della categoria 5 o se altri studi su animali o sugli effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per la salute umana;
- c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione ad una classe di rischio superiore, e se:
  - sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o
  - si osserva mortalità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o
  - i pareri degli esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o
  - i pareri degli esperti confermano l'esistenza di informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

**ESECUZIONE DEL TEST A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG**

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg. Al fine di proteggere gli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose di 5 000 mg/kg, che va presa in considerazione solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli animali o degli esseri umani.

**Studio di osservazione**

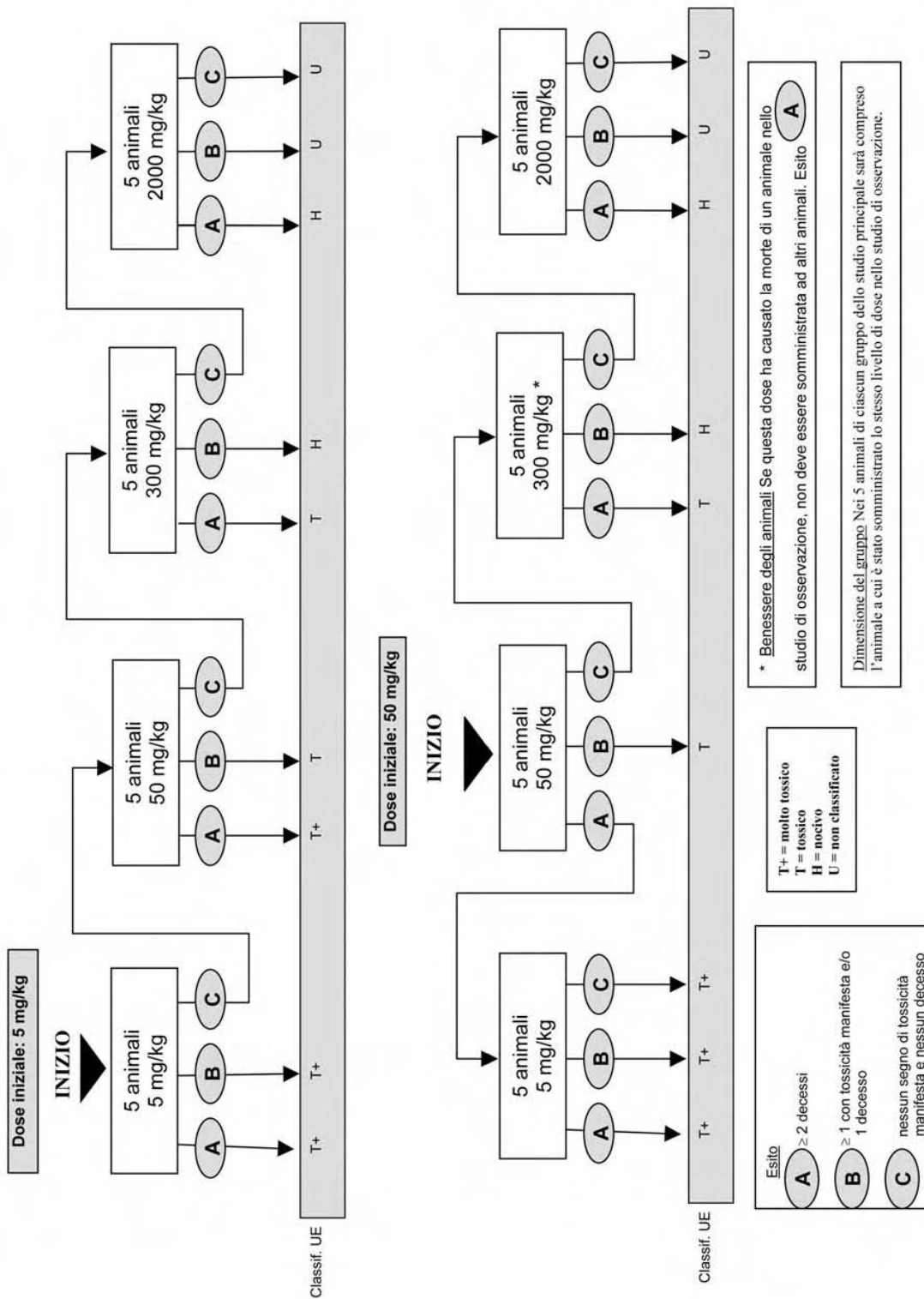
Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 1 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio di osservazione si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (decesso) si effettua il test su un secondo animale a 2 000 mg/kg; in caso di esito B o C (tossicità manifesta o nessun segno di tossicità) si può scegliere la dose di 5 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito B o C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A si utilizza la dose di 2 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale; in caso di esito B o C si utilizza la dose di 5 000 mg/kg.

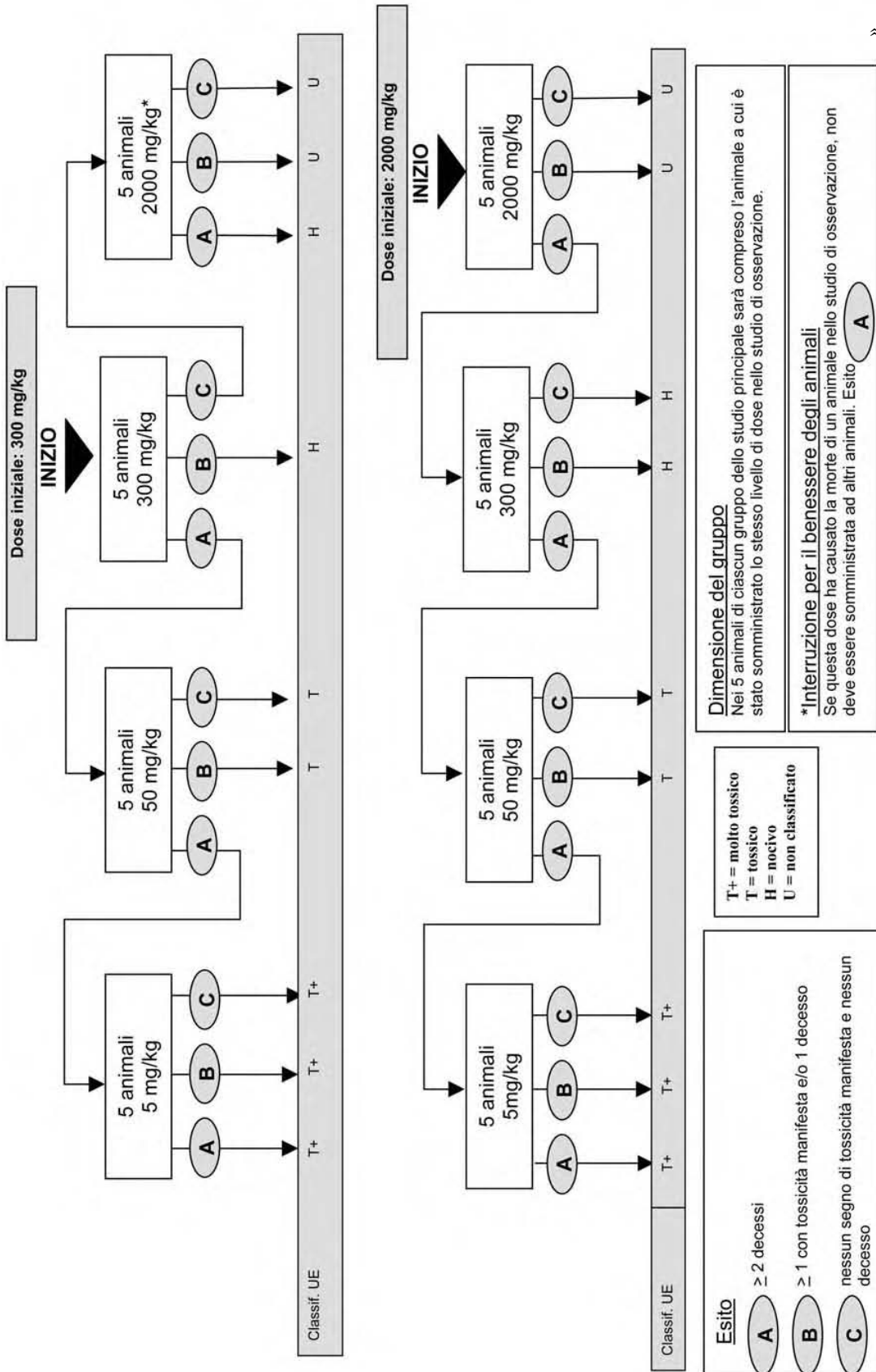
**Studio principale**

Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 2 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio principale si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (≥ 2 decessi) è necessario effettuare il test su un secondo gruppo a 2 000 mg/kg; in caso di esito B (tossicità evidente e/o ≤ 1 decesso) o C (nessun segno di tossicità) la sostanza non viene classificata nel sistema GHS. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A la sostanza è assegnata alla categoria 5 GHS, in caso di esito B o C la sostanza non è classificata.

ALLEGATO 4:

METODO DI PROVA B.1 bis – Guida alla classificazione transitoria UE in attesa dell'effettiva attuazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [cfr. riferimento bibliografico n. (8)]





ALLEGATO 2C

«B.1 ter. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE – METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

1. METODO

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUZIONE

Il metodo della classe di tossicità acuta (1) qui descritto è un procedimento articolato in più fasi successive che prevede l'uso di 3 animali dello stesso sesso in ogni fase. In media, per valutare la tossicità acuta di una sostanza sono necessarie 2-4 fasi, in funzione del numero di animali morti e/o moribondi. Il procedimento è riproducibile, utilizza un numero molto limitato di animali e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di determinazione della tossicità acuta. Il metodo della classe di tossicità acuta si basa su valutazioni biometriche (2)(3)(4)(5) e utilizza dosi fisse, opportunamente separate, per consentire la classificazione della sostanza ai fini dell'assegnazione a una particolare categoria e della valutazione dei rischi. Il metodo, adottato nel 1996, è stato ampiamente convalidato *in vivo* mediante dati sulla DL<sub>50</sub> ricavati dalla letteratura esistente, sia a livello nazionale (6) che a livello internazionale (7).

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per scopi specifici, si rimanda al documento orientativo sui saggi di tossicità acuta per via orale dell'OCSE (8). Tale documento contiene anche ulteriori informazioni sull'applicazione e sull'interpretazione del metodo di saggio B.1 ter.

Non è necessario somministrare le sostanze da esaminare in dosi che provocano notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto delle proprietà corrosive o fortemente irritanti delle sostanze stesse. Ai fini dell'interpretazione dei risultati del saggio, gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e assimilati agli animali morti spontaneamente nel corso dell'esperimento. I criteri da applicare per decidere in merito al sacrificio degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di uno specifico documento orientativo, che riporta anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (9).

Il metodo utilizza dosi prestabilite e i risultati che se ne ricavano permettono di classificare la sostanza esaminata conformemente al sistema armonizzato su scala mondiale (GHS) per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (10).

In linea di principio, il metodo non ha lo scopo di determinare una DL<sub>50</sub> precisa, ma consente di stabilire range di esposizione verosimilmente letali: la morte di una certa percentuale di animali, infatti, costituisce ancora l'endpoint principale di questo saggio. Il metodo consente di determinare un valore di DL<sub>50</sub> solo quando almeno due dosi provocano una mortalità superiore allo 0% e inferiore allo 100%. L'uso di dosi prestabilite, indipendentemente dalla sostanza in esame, e la classificazione esplicitamente legata al numero di animali osservati in diversi stati favoriscono la congruenza e la ripetibilità dei dati presentati dai vari laboratori.

Il laboratorio che esegue il saggio deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame prima di effettuare lo studio. Tali informazioni devono riguardare quantomeno l'identità e la struttura chimica; le proprietà chimico-fisiche; i risultati di eventuali altri saggi di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza; i dati tossicologici su sostanze di struttura affine; l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati la rilevanza del saggio per la protezione della salute degli esseri umani, e sono utili per la scelta della dose iniziale più appropriata.

1.2 DEFINIZIONI

**Tossicità acuta per via orale:** effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose di una sostanza o di più dosi nell'arco di 24 ore.

**Morte tardiva:** termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente nei 14 giorni del periodo di osservazione.

**Dose:** quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg).

**GHS:** sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche e dei relativi miscugli. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute degli esseri umani e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle sostanze pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'ILO (comunicazione dei rischi), coordinata dal programma inter-organizzazioni per una gestione responsabile delle sostanze chimiche (IOMC).

**Morte imminente:** stato in cui si prevede che l'animale sarà moribondo o morto prima della successiva osservazione in programma. Nei roditori, tra i segni indicativi di morte imminente sono compresi convulsioni, posizione laterale o prona e tremore [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

**DL<sub>50</sub> (dose letale mediana):** la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, che si prevede causi la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL<sub>50</sub> viene espresso in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

**Dose limite:** dose corrispondente al limite superiore fissato per il saggio (2 000 o 5 000 mg/kg).

**Moribondo:** che sta morendo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

**Morte prevedibile:** presenza di segni clinici, ad esempio incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

### 1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il metodo prevede l'applicazione di un procedimento articolato in fasi successive che richiede l'uso di un numero minimo di animali in ciascuna fase e permette di ricavare informazioni sufficienti per la classificazione della tossicità acuta della sostanza in esame. La sostanza viene somministrata per via orale a un gruppo di animali da laboratorio in una delle dosi prestabilite. Il saggio viene effettuato seguendo un procedimento in fasi successive; in ciascuna fase vengono utilizzati tre animali dello stesso sesso (normalmente femmine). In funzione della presenza o assenza di mortalità riferibile alla sostanza in esame tra gli animali trattati, per ciascuna fase si possono avere tre esiti diversi:

- interruzione del saggio
- somministrazione della sostanza ad altri tre animali, alla stessa dose
- somministrazione della sostanza ad altri tre animali al livello di dose immediatamente superiore o inferiore.

Lo schema dettagliato del procedimento è riportato nell'allegato 1. Il metodo consente di valutare la sostanza allo scopo di assegnarla a una delle classi di tossicità definite da valori discriminanti fissi di DL<sub>50</sub>.

### 1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

#### 1.4.1 Scelta delle specie di animali

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (9), perché la letteratura esistente circa i saggi convenzionali sulla DL<sub>50</sub> indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (11). Peraltro, se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche di struttura affine indicano che i maschi sono verosimilmente più sensibili delle femmine, si devono usare animali di sesso maschile. Qualora vengano usati animali di sesso maschile, se ne deve fornire un'adeguata motivazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Ciascun animale, all'inizio del trattamento, deve essere di età compresa fra 8 e 12 settimane e di peso compreso fra l'80 % e il 120 % del peso medio di eventuali animali a cui è stata precedentemente somministrata la sostanza in esame.

1.4.2 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C ( $\pm$  3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose, ma il numero di animali per gabbia non deve essere tale da impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

1.4.3 **Preparazione degli animali**

Gli animali devono essere scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 **Preparazione delle dosi**

In genere le somministrazioni delle sostanze in esame devono avere un volume costante per tutte le dosi oggetto del saggio; a questo scopo, si varia la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il saggio viene eseguito su prodotti o miscugli che si presentano in forma liquida, ai fini della successiva valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; peraltro, l'uso della sostanza non diluita è prescritto da alcune autorità di regolamentazione. In ogni caso, non si deve superare il volume massimo somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Nei roditori, di norma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa oppure, in ordine di preferenza, una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) o una soluzione in altri veicoli. Nel caso in cui si utilizzino veicoli diversi dall'acqua, devono essere note le caratteristiche di tossicità degli stessi. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e si sia dimostrata accettabile.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza da saggiare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Nel caso infrequente in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

Gli animali devono essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza (p. es. l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente nei ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, il cibo può essere sospeso per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali in misura adeguata alla durata del periodo di somministrazione.

1.5.2 **Numero di animali e livelli di dose**

Si utilizzano tre animali in ciascuna fase. La dose iniziale viene scelta fra quattro livelli fissi: 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg di peso corporeo. Il livello di dose iniziale deve essere quello che con maggior probabilità provoca la morte di una parte degli animali trattati. I diagrammi di flusso dell'allegato 1 illustrano il procedimento da seguire per ciascuna delle dosi iniziali, mentre l'allegato 4 riporta indicazioni sulla classificazione secondo il sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

Qualora, alla luce delle informazioni disponibili, la mortalità risulti improbabile al livello di dose iniziale più elevato (2 000 mg/kg di peso corporeo), si deve fare ricorso a un saggio limite. In mancanza di informazioni su una sostanza da esaminare, per il benessere degli animali si raccomanda di utilizzare la dose iniziale di 300 mg/kg di peso corporeo.

L'intervallo di tempo tra il trattamento dei diversi gruppi viene determinato in funzione dell'esordio, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere al trattamento degli animali alla dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente.



In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg (vedi allegato 2). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alle dosi stabilite per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di tali dosi è da prevedere solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute degli animali o dell'uomo o per la salvaguardia dell'ambiente.

### 1.5.3 Saggio limite

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame è verosimilmente non tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da conoscenze su composti, miscugli o prodotti simili esaminati, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Nel caso in cui le informazioni sulla tossicità della sostanza siano scarse o nulle, o in cui ci si attenda che la sostanza in esame sia tossica, il saggio principale deve essere eseguito.

Il saggio limite si effettua con un unico livello di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo su sei animali (tre animali per fase). In casi eccezionali, si può utilizzare un unico livello di dose di 5 000 mg/kg su tre animali (vedi allegato 2). Se si osservano decessi riferibili alla sostanza in esame, può essere necessario eseguire un altro saggio al livello di dose immediatamente inferiore.

## 1.6 OSSERVAZIONE

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, ponendo particolare attenzione nelle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni in tutto, tranne nel caso in cui sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per motivi legati al loro benessere, o nel caso in cui vengano rinvenuti morti. Tuttavia, la durata dell'osservazione non è tassativa, e va stabilita in funzione delle reazioni tossiche, del momento della loro insorgenza e della durata del periodo di recupero; se necessario, quindi, è possibile prolungarla. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva (12). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

Ulteriori osservazioni sono necessarie qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità. Dette osservazioni devono comprendere le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività e del comportamento somatomotori. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9). Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

### 1.6.1 Peso corporeo

I singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza da saggiare e in seguito almeno una volta alla settimana. Le variazioni ponderali devono essere calcolate e registrate. Al termine del saggio, gli animali sopravvissuti devono essere pesati e sottoposti a eutanasia.

### 1.6.2 Esame patologico

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del saggio e quelli che sono ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a necropsia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti potrebbe fornire indicazioni utili ed essere quindi opportuno.

2. **DATI**

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo del saggio, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e i risultati della necropsia.

3. **RELAZIONE**

3.1 **Relazione sul saggio**

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza in esame:

- natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione);
- dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se del caso):

- motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

- specie/ceppo utilizzato;
- condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;
- numero, età e sesso degli animali (compresa, se del caso, la motivazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine);
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

Condizioni sperimentali:

- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame, comprese informazioni sulla forma fisica del preparato somministrato;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame, compresi volumi e orari delle somministrazioni;
- informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza, provenienza dell'acqua);
- motivazione della scelta della dose iniziale.

Risultati:

- tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);
- tabella del peso corporeo e delle relative modificazioni;
- peso dei singoli animali il giorno della somministrazione, quindi a intervalli di una settimana, e infine al momento della morte o del sacrificio;
- data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato
- momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità, per ciascun animale;
- reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale.

Discussione e interpretazione dei risultati.

Conclusioni.

4.

**RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett.*, Suppl. 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559-610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC<sub>50</sub> Tests. *ALTEX* 16, 129-134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD<sub>50</sub> Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I, Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD<sub>50</sub>, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994 ). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.»

## ALLEGATO 1

**PROCEDIMENTO DA SEGUIRE PER CIASCUNA DELLE DOSI INIZIALI***OSSERVAZIONI GENERALI*

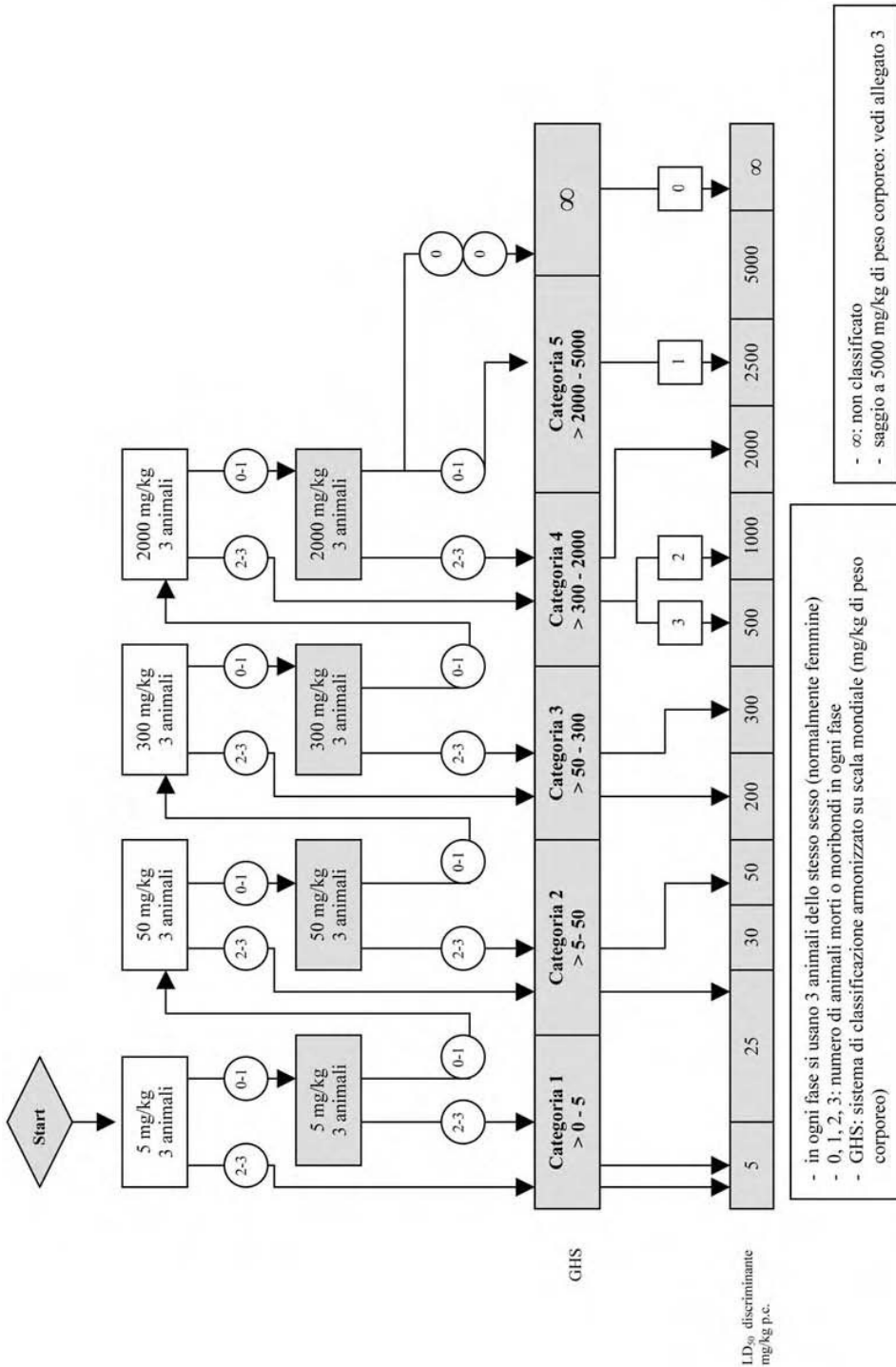
Il procedimento da seguire per ciascuna dose iniziale è indicato nei diagrammi di questo allegato.

- Allegato 1a: dose iniziale 5 mg/kg di peso corporeo
- Allegato 1b: dose iniziale 50 mg/kg di peso corporeo
- Allegato 1c: dose iniziale 300 mg/kg di peso corporeo
- Allegato 1d: dose iniziale 2 000 mg/kg di peso corporeo

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

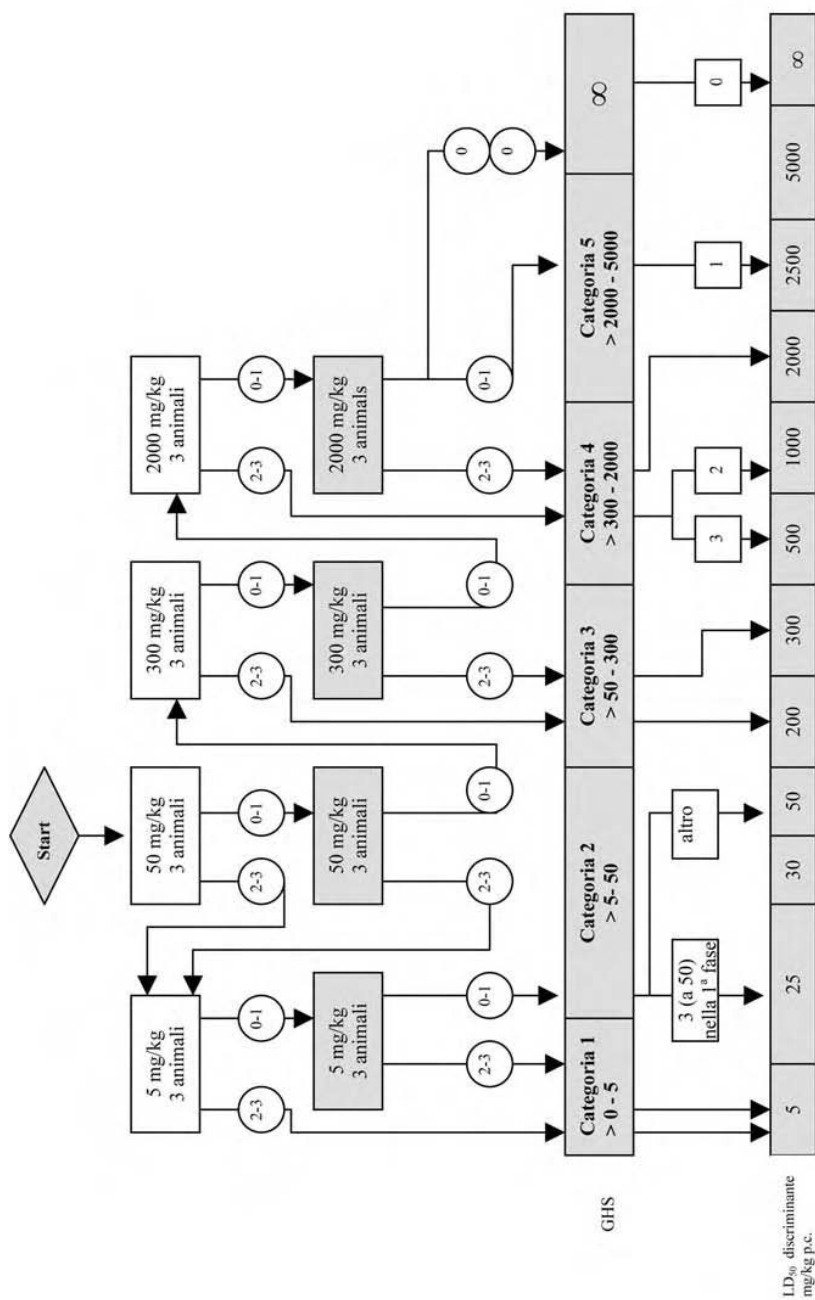
ALLEGATO 1 A

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 5 MG/KG DI PESO CORPOREO



ALLEGATO 1 B

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 50 MG/KG DI PESO CORPOREO

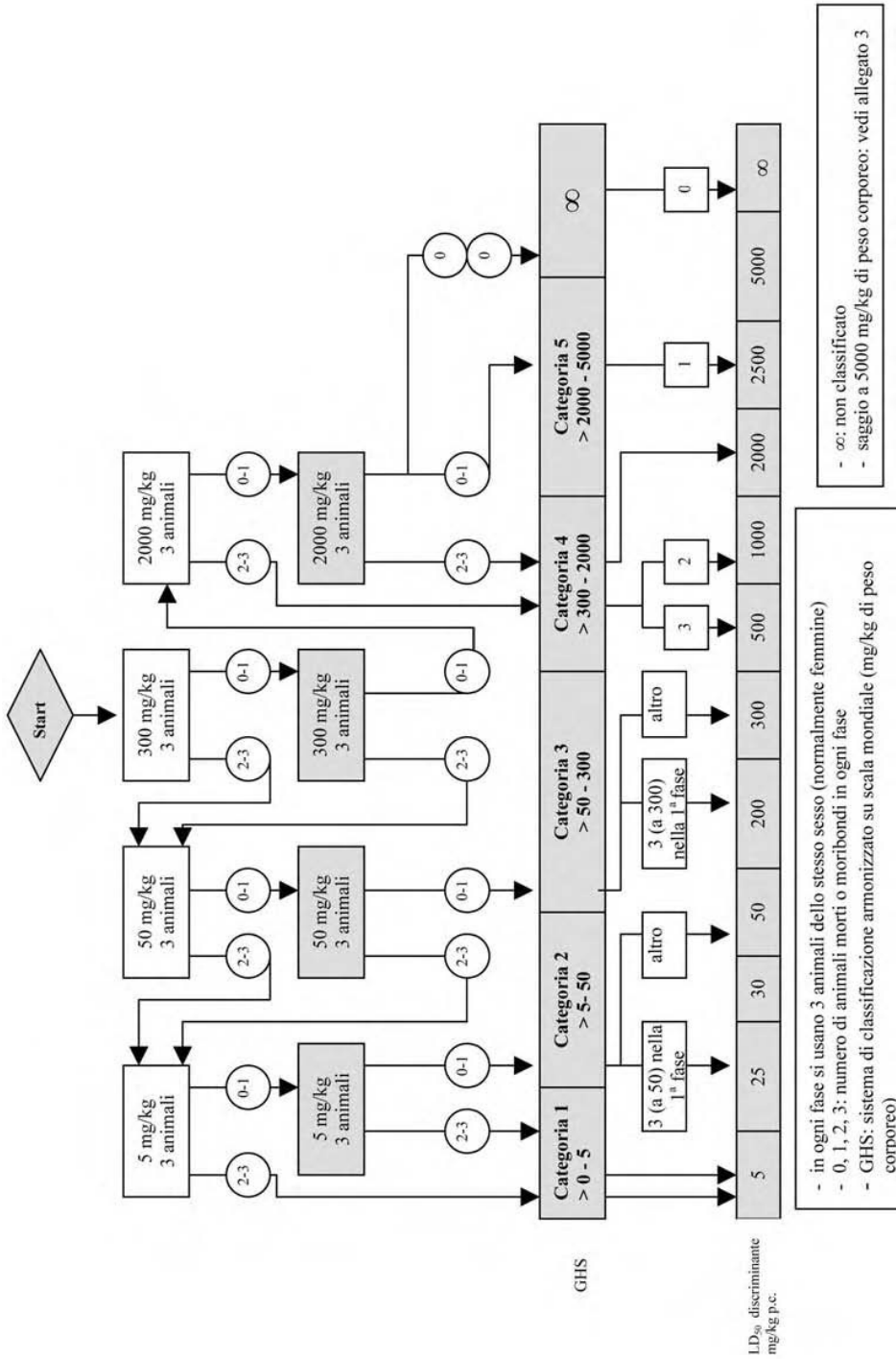


- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)  
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali morti o moribondi in ogni fase  
 - GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg di peso corporeo)

- ∞: non classificato  
 - saggio a 5000 mg/kg di peso corporeo: vedi allegato 3

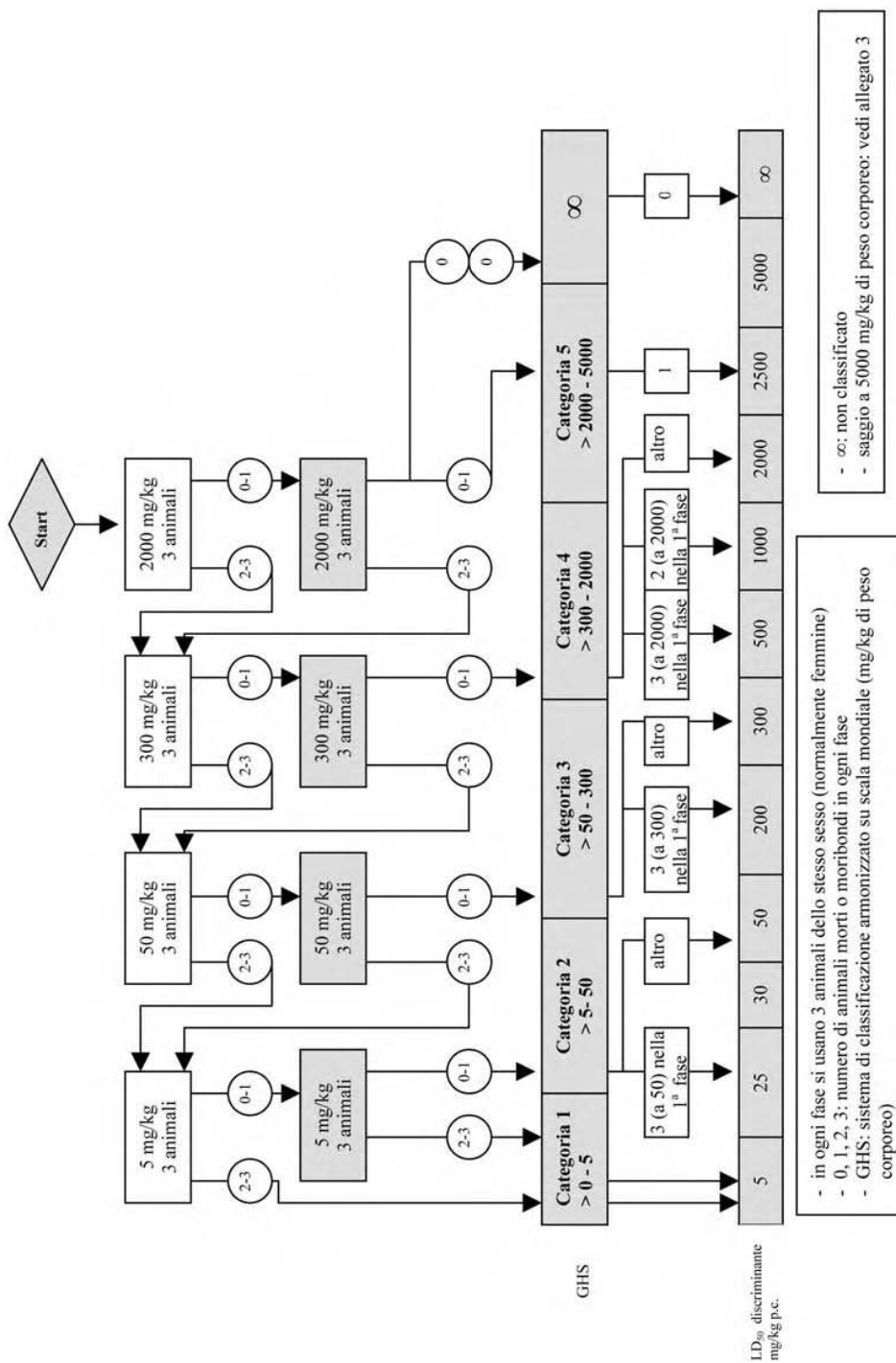
ALLEGATO 1 C

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 300 MG/KG DI PESO CORPOREO



ALLEGATO 1 D

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 2 000 MG/KG DI PESO CORPOREO





## ALLEGATO 2

**CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI DI DL<sub>50</sub> ATTESI SUPERIORI A 2 000 MG/KG SENZA BISOGNO DI ESEGUIRE UN SAGGIO DI TOSSICITÀ**

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 hanno lo scopo di consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che, in determinate situazioni, possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze che si prevede abbiano una DL<sub>50</sub> orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da:  $2\ 000\ \text{mg/kg} < \text{DL}_{50} < 5\ 000\ \text{mg/kg}$  (categoria 5 nel GHS) nei casi seguenti:

- a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 1a-1d porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;
- b) se sono già disponibili dati obiettivi attendibili che indicano che la DL<sub>50</sub> si situa nell'intervallo di valori della categoria 5, o se altri studi su animali o effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per l'uomo;
- c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione a una classe di rischio maggiore, e se
  - sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o
  - si osserva mortalità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o
  - valutazioni di esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o
  - valutazioni di esperti confermano informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

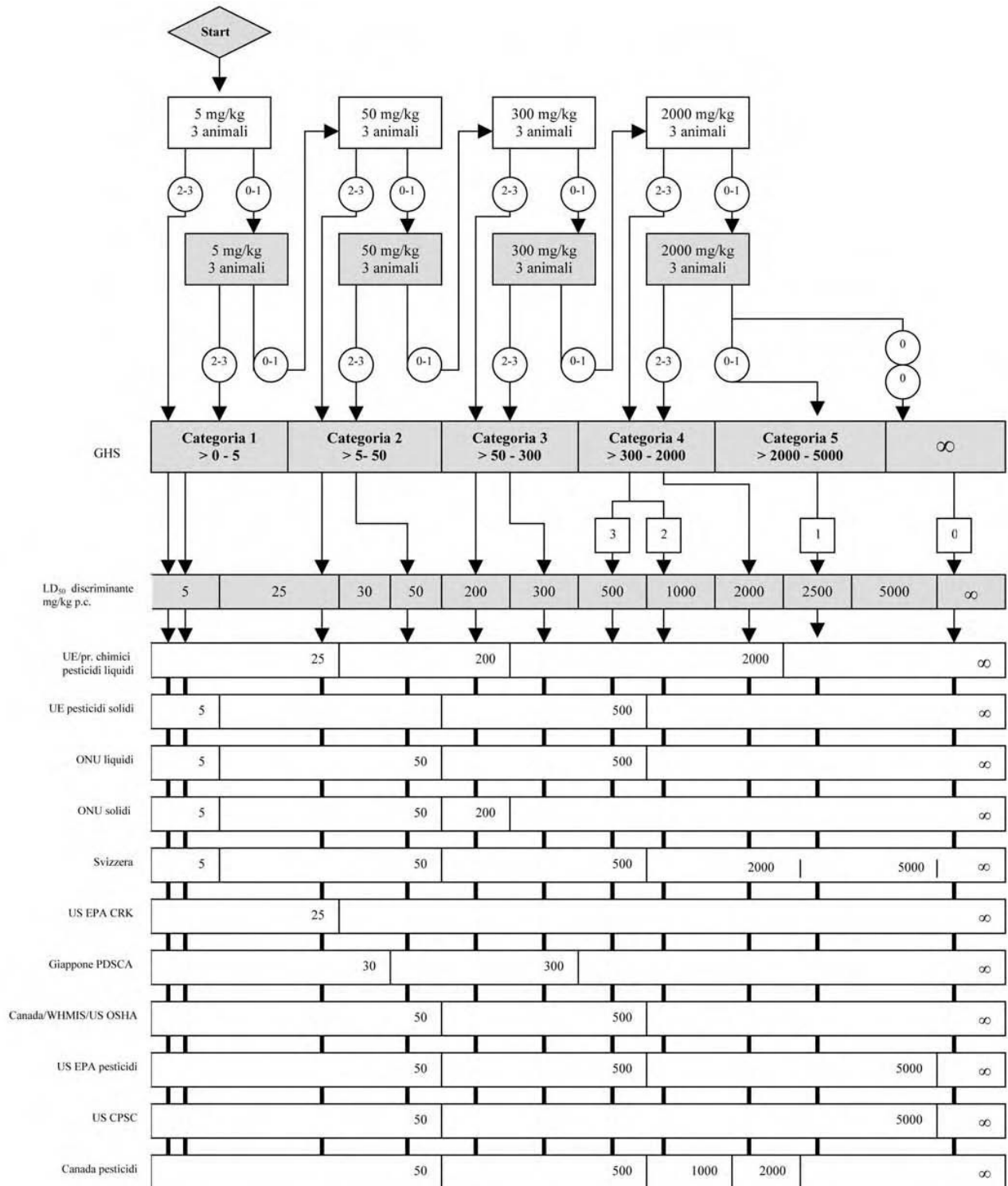
**ESECUZIONE DEL SAGGIO A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG**

Data la necessità di tutelare il benessere degli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose prevista per la categoria 5 (5 000 mg/kg); l'utilizzo di tale dose è da prevedere solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli esseri umani o degli animali (10). Non devono essere effettuati ulteriori saggi a livelli di dose superiori.

Quando è necessario effettuare un saggio di tossicità alla dose di 5 000 mg/kg, tale saggio deve essere eseguito in una sola fase (e quindi su tre animali). Se il primo animale a cui viene somministrata la sostanza muore, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg, così come indicato nei diagrammi di flusso dell'allegato 1. Se il primo animale sopravvive, la sostanza viene somministrata alla stessa dose ad altri due animali. Se solo uno dei tre animali muore, si ritiene che il valore di DL<sub>50</sub> sia superiore a 5 000 mg/kg. Se due animali muoiono, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg.

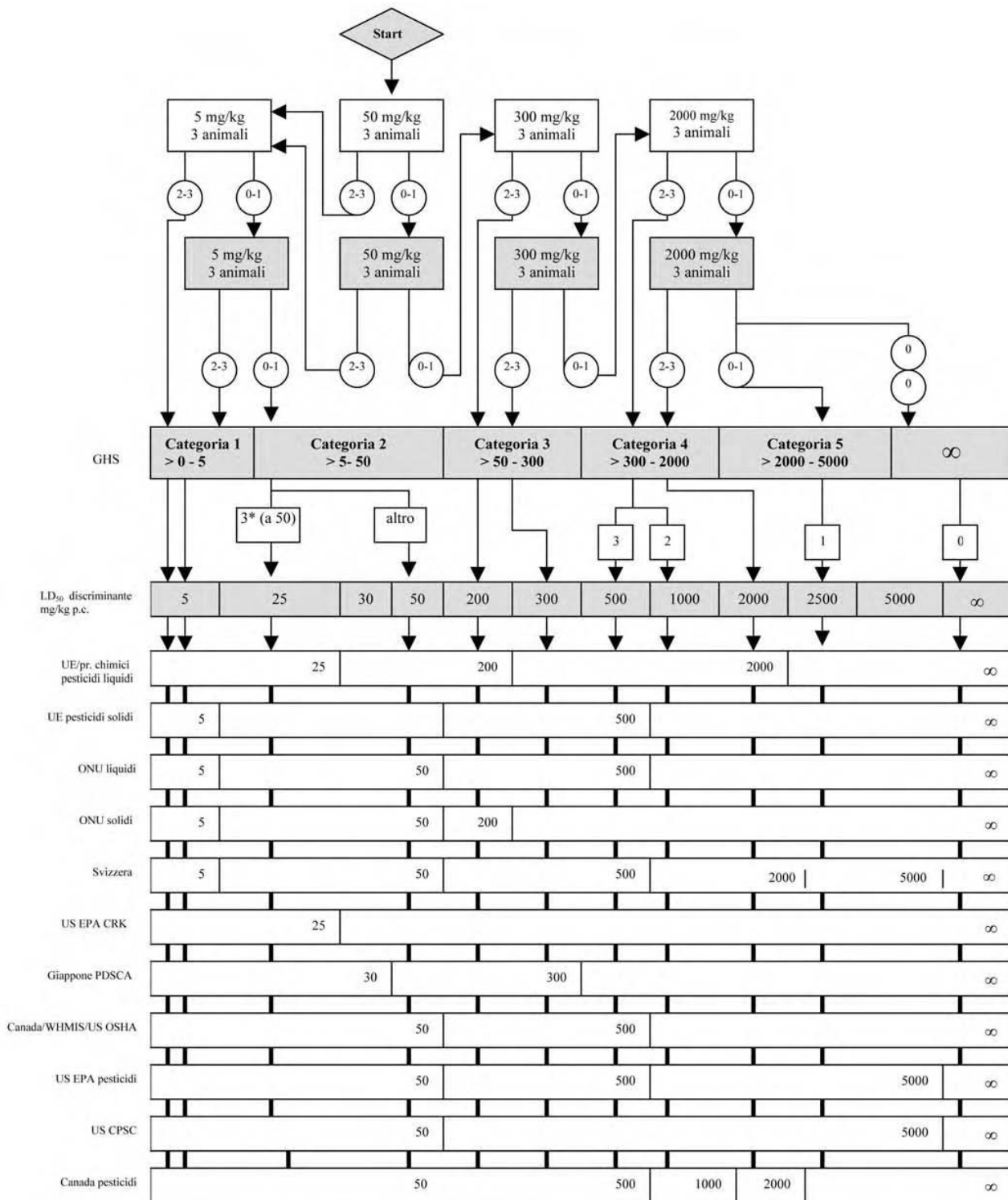
ALLEGATO 3

**METODO DI SAGGIO B.1 ter: indicazioni sulla classificazione secondo lo schema UE nel periodo di transizione in attesa della piena applicazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [ricavate dalla voce bibliografica (8)]**



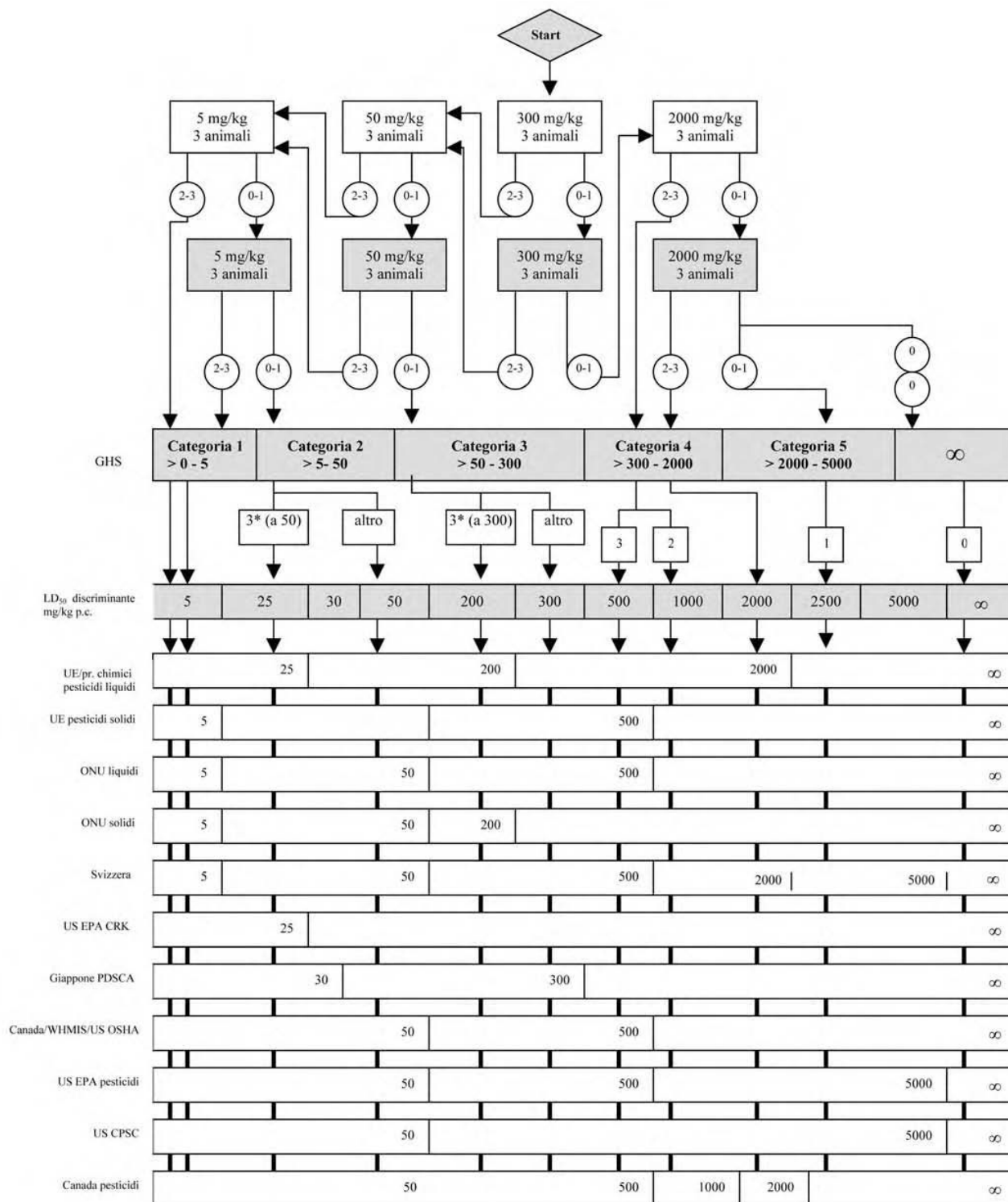
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)  
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato  
- GHS: sistema armonizzato di classificazione su scala mondiale (mg/kg p.c.)



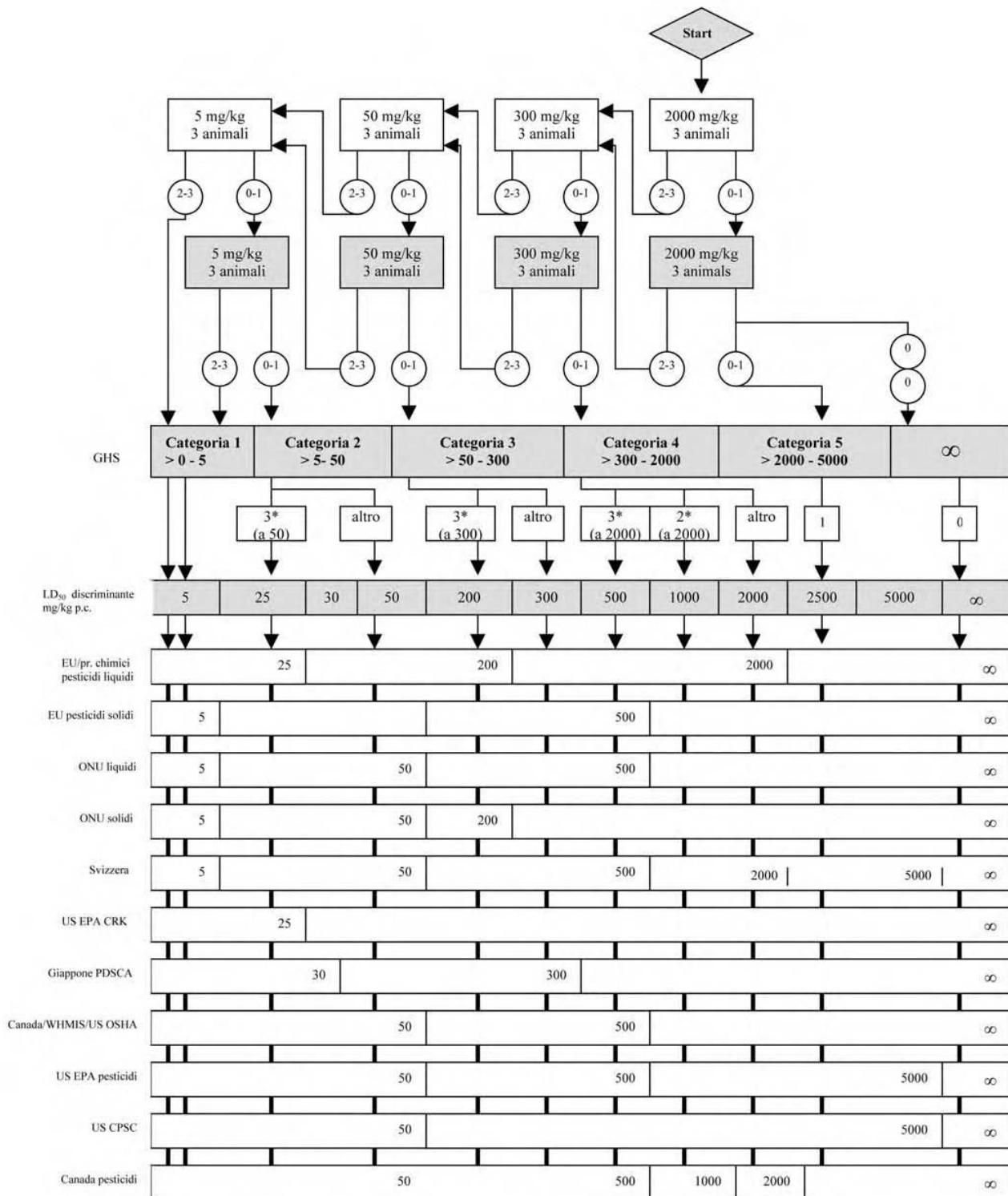
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)  
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato  
 - \*: nella prima fase  
 - GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)



- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)  
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato  
- \*: nella prima fase  
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)



- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)  
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato  
 - \*: nella prima fase  
 - GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)

## ALLEGATO 2D

## «B.4. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA

## 1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 404 (2002) dell'OCSE.

## 1.1 INTRODUZIONE

Nella preparazione di questo metodo aggiornato è stata dedicata particolare attenzione ai miglioramenti possibili in relazione al benessere degli animali e alla valutazione di tutte le informazioni disponibili e la sostanza in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio. Il metodo comprende la raccomandazione di eseguire, prima di effettuare il saggio *in vivo* descritto per la corrosione/irritazione, un'analisi dell'importanza delle prove (*weight-of-the-evidence analysis*) sui dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di svilupparli mediante l'applicazione di saggi sequenziali (1). La strategia di saggio raccomandata comprende l'esecuzione di saggi *in vitro* validati ed accettati ed è descritta nell'Allegato al presente metodo. Nel saggio iniziale *in vivo* si raccomanda inoltre di applicare, ove opportuno, all'animale i tre cerotti per il saggio da contatto uno dopo l'altro, anziché simultaneamente.

Nell'interesse sia dell'accuratezza scientifica, sia del benessere degli animali, non bisogna prendere in considerazione i saggi *in vivo* finché non siano stati valutati, in un'analisi dell'importanza delle prove, tutti i dati disponibili pertinenti circa la potenziale corrosività/irritazione cutanea della sostanza. Tali dati devono comprendere prove derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, prove di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza (2)(3), nonché i risultati di test *in vitro* o *ex vivo* validati ed accettati (4)(5)(5a). Questa analisi deve ridurre la necessità di eseguire test *in vivo* della corrosività/irritazione delle sostanze per le quali esistono già prove sufficienti derivanti da altri studi in relazione a questi due fattori.

Nell'Allegato al presente metodo è inclusa e consigliata una strategia a tappe, che prevede l'esecuzione di saggi validati *in vitro* o *ex vivo* per la corrosione/irritazione. Tale strategia è stata sviluppata e raccomandata all'unanimità dai partecipanti a un workshop dell'OCSE (6), ed è stata adottata come strategia raccomandata di test nel GHS (*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances*) (Sistema globale armonizzato per la classificazione delle sostanze chimiche) (7). Sebbene tale strategia dei saggi sequenziali non sia parte integrante del metodo di prova B.4., si raccomanda di adottarla prima di passare ai saggi *in vivo*. Nel caso di nuove sostanze, si raccomanda di adottare un approccio graduale per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza. Se per le sostanze esistenti i dati sulla corrosione/irritazione cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per ottenere i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura di saggio differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio di saggio graduale.

Se non è possibile determinare la corrosività o il potere irritante usando un'analisi dell'importanza delle prove, coerente con la strategia di saggi sequenziali, va preso in considerazione un saggio *in vivo* (cfr. Allegato).

## 1.2 DEFINIZIONI

**Irritazione cutanea:** produzione di danni reversibili alla pelle in seguito all'applicazione di una sostanza in esame per un massimo di 4 ore.

**Corrosione cutanea:** produzione di danni irreversibili alla pelle; in particolare, necrosi visibile attraverso l'epidermide e all'interno del derma, in seguito all'applicazione della sostanza in esame per un massimo di quattro ore. Le reazioni corrosive sono caratterizzate da ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, alla fine dell'osservazione, il giorno 14, da alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie effettuare eventualmente un esame istopatologico.

## 1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata in un'unica dose sulla pelle della cavia; le zone di pelle non trattate dell'animale servono da controllo. A intervalli specificati si valuta e si attribuisce un punteggio al grado di irritazione/corrosione, che va ulteriormente descritto per fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti osservati.

Gli animali che presentano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore, in qualsiasi fase del saggio, vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Cfr. bibliografia per i criteri da seguire nel decidere di sopprimere gli animali moribondi o che soffrono gravemente (8).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.4.1 **Preparazione per il saggio in vivo**

1.4.1.1 *Selezione delle specie*

L'animale da laboratorio di elezione è il coniglio albino; usare giovani adulti sani. Giustificare l'eventuale uso di altre specie.

1.4.1.2 *Preparazione degli animali*

All'incirca 24 ore prima del saggio occorre rasare il pelo nella zona dorsale del tronco degli animali evitando di scorticare la pelle. Usare solo animali la cui pelle è sana e intatta.

Alcuni ceppi di coniglio presentano zone di pelo più denso che sono più evidenti in alcuni periodi dell'anno. Tali aree di crescita densa del pelo non vanno usate come punti per il saggio.

1.4.1.3 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura del locale deve essere di 20 °C ( $\pm$  3 °C) per i conigli. L'umidità relativa deve raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, ma occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

1.4.2 **Procedura**

1.4.2.1 *Applicazione della sostanza in esame*

La sostanza in esame va applicata su una zona ridotta (circa 6 cm<sup>2</sup>) di pelle e coperta con una garza fissata con un cerotto non irritante. Nei casi in cui non è possibile l'applicazione diretta (ad es. liquidi e alcune paste), la sostanza in esame va prima applicata sulla garza, che poi è a sua volta applicata sulla pelle. La garza va mantenuta a contatto con la pelle, ma allentata, mediante una fasciatura semioclusiva, per tutta la durata del periodo di esposizione. Se la sostanza in esame è applicata sulla garza, essa va appoggiata sulla pelle in modo che la sostanza sia bene a contatto e si distribuisca uniformemente. Occorre impedire che l'animale abbia accesso alla garza e ingerisca o inalizzi la sostanza in esame.

Le sostanze sperimentali liquide si usano generalmente non diluite. Per l'esame dei solidi (che possono essere ridotti in polvere, se ritenuto necessario) la sostanza in esame va inumidita con la minor quantità d'acqua (o, ove necessario, di un altro eccipiente adeguato) sufficiente ad assicurare un buon contatto con la pelle. Se si impiegano eccipienti diversi dall'acqua, la potenziale influenza dell'eccipiente sull'irritazione della pelle da parte della sostanza in esame deve essere minima o nulla.

Al termine del periodo di esposizione, che è normalmente di 4 ore, la sostanza in esame residua va rimossa, ove possibile, usando acqua o un solvente adeguato senza alterare la risposta da essa provocata e l'integrità dell'epidermide.

1.4.2.2 *Livello di dosi*

Sul punto prescelto per il saggio va applicata una dose di 0,5 ml. di liquido o 0,5 g di solido o pasta.

1.4.2.3 *Saggio iniziale (Saggio di irritazione/corrosione cutanea in vivo su un solo animale)*

Si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente il saggio in vivo usando un solo animale, soprattutto quando si sospetta che la sostanza sia potenzialmente corrosiva, in conformità alla strategia dei saggi sequenziali (cfr. Allegato 1).

Quando una sostanza è stata giudicata corrosiva sulla base di un'analisi dell'importanza delle prove, non è necessario eseguire ulteriori saggi su animali. Per la maggior parte delle sostanze sospettate di essere corrosive, non è normalmente necessario eseguire ulteriori saggi *in vivo*. Tuttavia, nei casi in cui si ritiene giustificato ottenere altri dati, in quanto le prove sono insufficienti, è possibile effettuare saggi limitati su animali secondo l'approccio seguente: all'animale si applicano un massimo di tre cerotti con garza per il saggio da contatto, in sequenza. Il primo cerotto è tolto dopo tre minuti. Se non si osservano reazioni cutanee gravi, si applica un secondo cerotto, che è rimosso dopo un'ora. Se le osservazioni in questa fase indicano che è possibile estendere l'esposizione a quattro ore, senza causare sofferenze, si applica un terzo cerotto, che è rimosso dopo quattro ore, e si valuta la reazione.

Se dopo una qualsiasi delle tre esposizioni in sequenza si osserva un effetto corrosivo, il saggio va immediatamente interrotto. Se dopo la rimozione dell'ultimo cerotto non si osserva alcun effetto corrosivo, si mantiene l'animale sotto osservazione per 14 giorni, a meno che la corrosione non si manifesti più precocemente.

Nei casi in cui non si prevede che la sostanza in esame produca corrosione, ma che possa essere irritante, applicare un unico cerotto a un solo animale per quattro ore.

1.4.2.4 *Saggio di conferma (saggio di irritazione cutanea in vivo con ulteriori animali)*

Se nel saggio iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su due altri animali al massimo, ciascuno con un cerotto, per un periodo di esposizione di quattro ore. Se nel saggio iniziale si osserva un effetto irritante, il saggio di conferma può essere condotto in maniera sequenziale, oppure esponendo contemporaneamente due altri animali. Nel caso eccezionale in cui non sia eseguito il saggio iniziale, è possibile trattare due o tre animali con un solo cerotto, che è poi asportato dopo quattro ore. Quando si usano due animali, se entrambi evidenziano la stessa reazione, non sono necessari altri saggi, altrimenti si sottopone al saggio anche il terzo animale. È possibile che siano necessari altri animali per valutare le reazioni dubbie.

1.4.2.5 *Periodo di osservazione*

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente la reversibilità degli effetti osservati. Interrompere però l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni continui di dolore o sofferenza gravi. Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati per un massimo di 14 giorni dopo la rimozione dei cerotti. In caso di reversibilità prima dei 14 giorni, interrompere subito l'esperimento.

1.4.2.6 *Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni cutanee*

Esaminare tutti gli animali per vedere se presentano segni di eritema e di edema e valutare le reazioni a 60 minuti e successivamente a 24, 48 e 72 ore dopo la rimozione del cerotto. Per il saggio iniziale su un solo animale, esaminare subito la zona prescelta per il saggio dopo la rimozione del cerotto. Le reazioni cutanee sono classificate e registrate in base ai gradi indicati nella tabella allegata. Se la pelle presenta una lesione che non può essere identificata come irritazione o corrosione a 72 ore, può essere necessario proseguire le osservazioni fino al giorno 14, per determinare la reversibilità degli effetti. Oltre alle osservazioni dell'irritazione, descrivere e documentare tutti gli effetti tossici locali, come la perdita del grasso cutaneo, ed eventuali effetti sistemici negativi (ad es. effetti sui segni clinici di tossicità e sul peso corporeo). Per chiarire le reazioni dubbie, valutare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

La classificazione delle reazioni cutanee è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono il saggio e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio usato (cfr. tabella più avanti). Potrebbe essere utile una guida illustrata per la classificazione dell'irritazione cutanea e di altre lesioni (9). La classificazione delle reazioni cutanee va valutata in cieco.

2. **DATI**

2.1 PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio vanno riassunti sotto forma di tabella nella relazione finale sul saggio e devono coprire tutte le voci elencate al punto 3.1.



2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Valutare il grado di irritazione cutanea insieme alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. Le reazioni individuali non rappresentano uno standard assoluto per le proprietà irritanti di un materiale, in quanto si valutano anche altri effetti del materiale in esame. I risultati individuali vanno invece considerati come valori di riferimento e devono essere valutati insieme a tutte le altre osservazioni emerse dallo studio.

Nella valutazione delle reazioni irritanti è necessario considerare la reversibilità delle lesioni cutanee. Quando reazioni quali alopecia (zona limitata), ipercheratosi, iperplasia e desquamazione persistono fino alla fine del periodo di osservazione di 14 giorni, la sostanza in esame va considerata irritante.

3. **RAPPORTO**

3.1 RAPPORTO SUL SAGGIO

Il rapporto deve contenere le seguenti informazioni:

Giustificazione del saggio *in vivo*: analisi dell'importanza delle prove di dati pre-esistenti, compresi i risultati della strategia dei saggi sequenziali:

- descrizione dei dati pertinenti disponibili da saggi precedenti;
- dati ricavati in ciascuna fase della strategia dei saggi;
- descrizione dei saggi *in vitro* eseguiti, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze in esame/di riferimento;
- analisi dell'importanza delle prove per l'esecuzione dello studio *in vivo*.

Sostanza in esame:

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

Eccipiente:

- identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;
- giustificazione della scelta dell'eccipiente.

Cavie:

- specie/ceppo usato, motivazione per l'uso di animali diversi dal coniglio albino;
- numero di animali di ciascun sesso;
- peso di ciascun singolo animale all'inizio e alla conclusione del saggio;
- età all'inizio dello studio;
- origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc..

Condizioni del saggio:

- tecnica di preparazione del punto di applicazione del cerotto;
- dettagli relativi al materiale del cerotto e alla tecnica di applicazione del cerotto;
- dettagli relativi a preparazione, applicazione e rimozione della sostanza in esame.

Risultati:

- tabulazione dei punteggi delle reazioni di irritazione/corrosione per ciascun animale in tutti i momenti di misurazione;
- descrizione di tutte le lesioni osservate;
- descrizione della natura e del grado di irritazione o corrosione osservate e degli eventuali reperti istopatologici;
- descrizione di altri effetti negativi locali (ad es. perdita del grasso cutaneo) e sistemici oltre all'irritazione e alla corrosione cutanea.

Discussione dei risultati

4.

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzthutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483-524.
- (5a) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996. (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998. (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Available from OECD Secretariat upon request].

**TABELLA I: CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI CUTANEE**

**Eritema e formazione di escara**

Assenza di eritema .....	0
Eritema molto lieve (appena percettibile) .....	1
Eritema ben definito .....	2
Eritema da moderato a grave .....	3
Eritema grave (rosso vivo) fino alla formazione di escara che impedisce la classificazione dell'eritema .....	4

Massimo possibile: 4

**Formazione di edema**

Assenza di edema .....	0
Edema molto lieve (appena percettibile) .....	1
Edema lieve (bordi dell'area ben definiti dal gonfiore) .....	2
Edema moderato (area sollevata di circa 1 mm) .....	3
Edema grave (area sollevata di oltre 1 mm ed estesa oltre la zona di esposizione) .....	4

Massimo possibile: 4

Per chiarire le reazioni dubbie è possibile eseguire un esame istopatologico.

## ALLEGATO

## Strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione cutanee

## CONSIDERAZIONI GENERALI

Questa strategia dei saggi sequenziali non è parte integrante del metodo di prova B.4., ma esprime l'approccio raccomandato per determinare le caratteristiche di irritazione/corrosione cutanea. Tale approccio rappresenta sia la migliore prassi che un punto di riferimento etico per l'esecuzione di saggi *in vivo* sull'irritazione/corrosione cutanea. Il metodo di prova fornisce indicazioni su come eseguire il saggio *in vivo* e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione tale saggio. La strategia dei saggi sequenziali fornisce un approccio per valutare i dati esistenti sulle caratteristiche di irritazione/corrosione cutanea delle sostanze e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze sulle quali sono necessari ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. Essa raccomanda inoltre l'esecuzione di saggi validati ed accettati *in vitro* o *ex vivo* di irritazione/corrosione cutanea in circostanze specifiche.

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, è importante evitare l'uso non necessario di animali e ridurre al minimo i saggi atti a provocare reazioni gravi. Valutare tutte le informazioni relative alla potenziale irritazione/corrosività cutanea di una sostanza prima di prendere in considerazione i saggi *in vivo*. È possibile che esistano già prove sufficienti per classificare il potenziale di irritazione o corrosione cutanea di una sostanza in esame, senza bisogno di effettuare saggi su animali da laboratorio. L'analisi dell'importanza delle prove e una strategia dei saggi sequenziali ridurranno al minimo la necessità di eseguire saggi *in vivo*, soprattutto se è probabile che la sostanza provochi reazioni gravi.

Si raccomanda l'uso di un'analisi dell'importanza delle prove per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione cutanea delle sostanze e determinare se occorre eseguire altri studi, diversi da quelli cutanei *in vivo*, per caratterizzare meglio tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze senza una documentazione sperimentale, usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati necessari al fine di valutarne il potenziale di corrosività/irritazione cutanea. La strategia dei saggi descritta nel presente allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1), ed è stata successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), come approvato alla 28ª riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2).

## DESCRIZIONE DELLA STRATEGIA DI VALUTAZIONE E SAGGI

Prima di effettuare saggi nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali (Figura), occorre valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di saggi cutanei *in vivo*. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione sull'importanza delle prove vanno valutati tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza in questione e dei suoi analoghi strutturali e occorre giustificare tale decisione. Dare soprattutto importanza ai dati esistenti sulla sostanza riguardo a persone e animali, seguiti dal risultato dei saggi *in vitro* o *ex vivo*. Ove possibile, vanno evitati gli studi *in vivo* delle sostanze corrosive. I fattori considerati nella strategia di saggio sono:

*Valutazione dei dati esistenti su soggetti umani e animali (Fase 1).* Considerare innanzi tutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi, e/o dati relativi a saggi su animali, ad es. da studi di tossicità da esposizione cutanea singola o ripetuta) in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sulla pelle. Non occorre sottoporre a saggi *in vivo* le sostanze notoriamente irritanti o corrosive, nonché quelle che hanno dimostrato inequivocabilmente di non essere corrosive e di non avere potere irritante.

*Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2).* Si devono considerare i risultati dei saggi di sostanze chimiche strutturalmente correlate, ove disponibili. Quando sono disponibili dati su persone e/o animali riguardo a sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze sufficienti a indicarne il potenziale di corrosione/irritazione cutanea, si può presumere che la sostanza in esame produrrà le stesse reazioni. In questi casi non è probabilmente necessario saggiare la sostanza. Dati negativi derivanti da studi di sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze non costituiscono una prova sufficiente di non corrosività/non potere irritante di una sostanza nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali. Per identificare il potenziale di corrosione e irritazione cutanea usare approcci SAR validati ed accettati.

*Proprietà fisico-chimiche e reattività chimica (Fase 3).* Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es.  $\leq 2,0$  o  $\geq 11,5$ , possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per l'identificazione di una sostanza come corrosiva per la pelle, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (3)(4). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza può non essere corrosiva per la pelle, è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza un saggio *in vitro* o *ex vivo* validato ed accettato (cfr. fasi 5 e 6).

*Tossicità cutanea (Fase 4).* Se una sostanza chimica è risultata molto tossica per via cutanea, non è probabilmente praticabile uno studio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo*, poiché la quantità di sostanza in esame normalmente applicata potrebbe superare la dose altamente tossica e, di conseguenza, provocare la morte o grave sofferenza degli animali. Inoltre,

se sono già stati eseguiti studi di tossicità cutanea su conigli albini fino al livello limite di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo o superiori, e non è stata osservata irritazione o corrosione cutanea, diventano superflui ulteriori saggi per l'irritazione/corrosione cutanea. Quando si valuta la tossicità cutanea acuta in studi eseguiti in precedenza occorre tenere presenti numerose considerazioni. Per esempio, le informazioni riferite sulle lesioni cutanee possono essere incomplete. È possibile che i saggi e le osservazioni siano stati eseguiti su una specie diversa dal coniglio, e la sensibilità della reazione delle varie specie può essere molto diversa. Inoltre, è possibile che la forma della sostanza in esame applicata agli animali non fosse adeguata per la valutazione dell'irritazione/corrosione cutanea (ad es. diluizione delle sostanze per i saggi della tossicità cutanea) (5). Tuttavia, nel caso di studi di tossicità cutanea ben concepiti e ben condotti sui conigli, i risultati negativi possono essere considerati una prova sufficiente che la sostanza non è corrosiva o irritante.

*Risultati dei saggi in vitro o ex vivo (Fasi 5 e 6).* Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in un saggio *in vitro* o *ex vivo* (6)(7) concepito per la valutazione di questi effetti specifici. Si può presumere che tali sostanze produrranno effetti analogamente gravi anche *in vivo*.

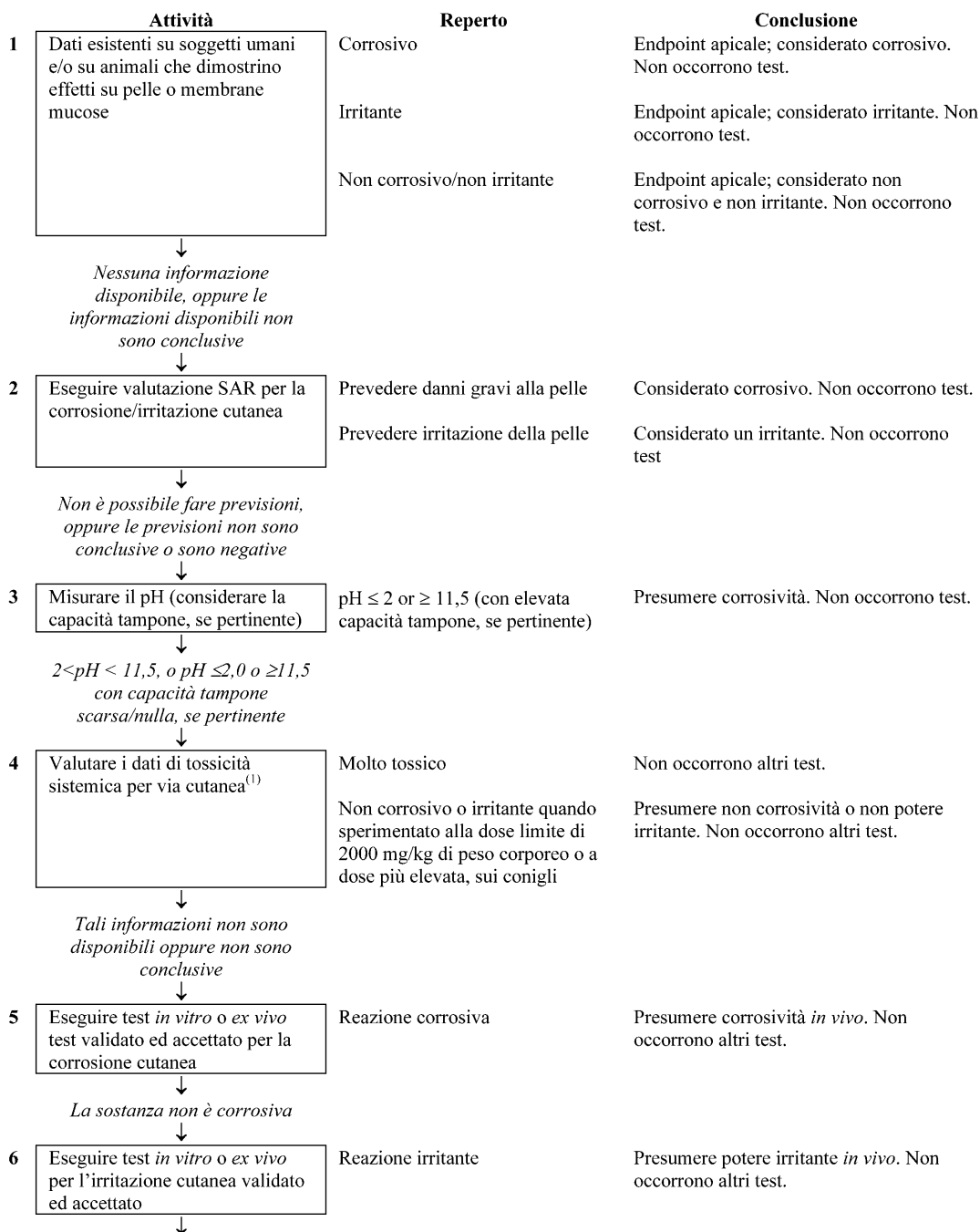
*Saggio in vivo nei conigli (Fasi 7 e 8).* Qualora in base all'analisi dell'importanza delle prove si arrivasse alla decisione di eseguire un saggio *in vivo*, esso deve cominciare con un saggio iniziale su un solo animale. Se i risultati di tale saggio indicano che la sostanza è corrosiva per la pelle, non si devono effettuare altri saggi. Se invece il saggio iniziale non rivela un effetto corrosivo, la reazione irritante o negativa va confermata usando al massimo due altri animali per un periodo di esposizione di quattro ore. Se il saggio iniziale rivela un effetto irritante, il saggio di conferma può essere condotto in maniera sequenziale, oppure esponendo contemporaneamente i due animali aggiuntivi.

#### BIBLIOGRAFIA

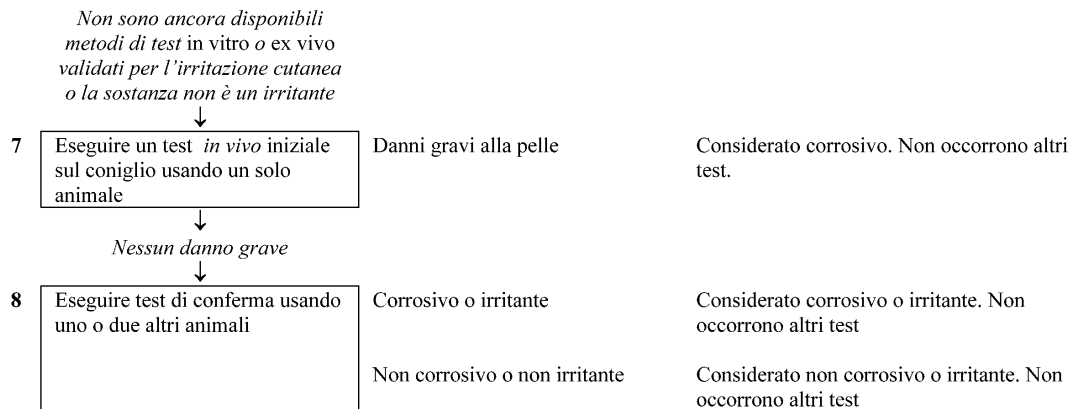
- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/tests/background/htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) pp 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.
- (6) Metodo di prova B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483–524.

FIGURA

STRATEGIA DI TEST E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA



<sup>(1)</sup> Può essere preso in considerazione prima delle Fasi 2 e 3.



»

—

ALLEGATO 2E

«B.5. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 405 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella preparazione di questo metodo aggiornato è stata dedicata particolare attenzione ai possibili miglioramenti, mediante la valutazione di tutte le informazioni disponibili circa la sostanza in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio e tener conto del benessere degli animali. Questo metodo include la raccomandazione, prima di effettuare il saggio *in vivo* descritto per l'irritazione/corrosione oculare acuta, di una analisi accurata dei dati disponibili e pertinenti (*weight-of-the-evidence analysis*) (1) sui dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di ottenerli mediante l'applicazione di saggio sequenziali (2)(3). La strategia saggioraccomandata comprende l'esecuzione di saggio *in vitro* validati ed accettati ed è descritta nell'Allegato al metodo. Inoltre, si raccomanda l'uso di un saggio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* per prevedere la corrosione oculare prima di considerare un saggio oculare *in vivo*.

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, non bisogna prendere in considerazione i saggio *in vivo* finché non siano stati valutati, considerando l'importanza delle prove, tutti i dati disponibili pertinenti circa la potenziale corrosività/irritazione oculare della sostanza. Tali dati devono comprendere prove derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, prove di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza (4)(5), nonché i risultati di saggio *in vitro* o *ex vivo* validati ed accettati per la corrosione e l'irritazione cutanea (6)(6a). Gli studi possono essere stati condotti prima di un'analisi dell'importanza delle prove, o in conseguenza di essa.

Per alcune sostanze, un'analisi di questo tipo può indicare la necessità di studi *in vivo* del potenziale di corrosione/irritazione oculare. In tutti questi casi, prima di considerare l'uso del saggio oculare *in vivo*, va preferibilmente condotto uno studio sugli effetti cutanei *in vivo* della sostanza, evaluate in base al metodo B.4 (7). L'applicazione di un'analisi dell'importanza delle prove e la strategia dei saggio sequenziali dovrebbe ridurre la necessità di eseguire saggio *in vivo* della corrosività/irritazione delle sostanze per le quali esistano già prove sufficienti derivanti da altri studi. Qualora non sia possibile determinare il potenziale di corrosione o irritazione oculare usando la strategia dei saggio sequenziali, anche dopo l'esecuzione di uno studio *in vivo* della corrosione e dell'irritazione della cute, si può effettuare un saggio *in vivo* della corrosione/irritazione oculare.

Nell'Allegato al presente metodo di prova è inclusa la strategia dei saggio sequenziali da preferirsi, che prevede l'esecuzione di saggio validati *in vitro* o *ex vivo* per la corrosione/irritazione. Tale strategia è stata sviluppata e raccomandata all'unanimità dai partecipanti a un workshop dell'OCSE (8), ed è stata adottata come strategia raccomandata di saggio nel GHS (*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances*) (Sistema globale armonizzato per la classificazione delle sostanze chimiche) (9). Sebbene tale strategia dei saggio sequenziali non sia parte integrante del metodo di prova B.4, si raccomanda che venga seguita prima di passare ai saggio *in vivo*. Per le nuove sostanze, si raccomanda di adottare una strategia a "tappesaggio" (*stepwise*), per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza. Se per le sostanze esistenti i dati sulla corrosione/irritazione oculare e cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per recuperare i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura di saggio differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio di saggio "per gradi."

1.2 DEFINIZIONI

**Irritazione oculare:** produzione di alterazioni nell'occhio in seguito all'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, completamente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione.

**Corrosione oculare:** produzione di lesioni del tessuto oculare o di un grave deterioramento fisico della vista, in seguito all'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, non completamente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione.



1.3 PRINCIPIO DEL METODO SAGGIO

La sostanza in esame è applicata in un'unica dose su uno degli occhi dell'animale sperimentale; l'occhio non trattato serve da controllo. Il grado di irritazione/corrosione è valutato dando un punteggio alle lesioni di congiuntiva, cornea e iride, a intervalli di tempo specifici. Sono descritti anche altri effetti sull'occhio ed effetti negativi sistemici, con l'obiettivo di fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti.

Gli animali che presentano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore, in qualsiasi fase del saggio, vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Cfr. bibliografia per i criteri da seguire nel decidere l'eutanasia di animali moribondi o che soffrono gravemente (10).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO SAGGIO

1.4.1 **Preparazione per il saggio in vivo**

1.4.1.1 *Selezione delle specie*

L'animale da laboratorio di elezione è il coniglio albino, del quale vanno utilizzati giovani adulti sani. Giustificare l'eventuale uso di altri ceppi o specie.

1.4.1.2 *Preparazione degli animali*

Entro 24 ore dall'inizio del saggio è necessario esaminare entrambi gli occhi di ciascun animale sperimentale provvisoriamente selezionato per il saggio. Non vanno utilizzati animali che presentino irritazione oculare, difetti degli occhi o preesistenti lesioni corneali.

1.4.1.3 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura del locale deve essere di 20 °C ( $\pm$  3 °C) per i conigli. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

1.4.2 **Procedura**

1.4.2.1 *Applicazione della sostanza in esame*

La sostanza in esame va posta nel sacco congiuntivale di un occhio di ciascun animale, dopo aver allontanato delicatamente la palpebra inferiore dal bulbo. Le palpebre vanno poi tenute unite con delicatezza per circa un secondo, per evitare la fuoriuscita del materiale. L'altro occhio, che non viene trattato, serve da controllo.

1.4.2.2 *Irrigazione*

Gli occhi degli animali sperimentali non vanno lavati per almeno 24 ore dopo l'instillazione della sostanza in esame, tranne nel caso di saggio di sostanze solide (cfr. punto 1.4.2.3.2), e nel caso di effetti corrosivi o irritanti immediati. Dopo 24 ore è possibile effettuare un lavaggio, se lo si considera necessario.

Non si raccomanda l'uso di un gruppo satellite di animali per studiare l'influenza del lavaggio oculare, a meno che ciò non risulti scientificamente giustificato. Qualora sia necessario un gruppo satellite, vanno usati due conigli. Le condizioni del lavaggio vanno documentate accuratamente: momento del lavaggio, composizione e temperatura della soluzione di lavaggio, durata, volume e velocità di applicazione.

1.4.2.3 *Livello di dosi*

1.4.2.3.1 *Saggio di liquidi*

Per saggiare i liquidi usare una dose di 0,1 ml. Non usare spray per instillare la sostanza direttamente nell'occhio; lo spray liquido va spruzzato e raccolto in un contenitore prima di instillarne 0,1 ml nell'occhio.

1.4.2.3.2 *Saggio di solidi*

Nei saggio di sostanze solide, paste e sostanze particellari, la quantità impiegata deve avere un volume di 0,1 ml o un peso non superiore a 100 mg. Il materiale in esame va ridotto in polvere fine. Prima della misurazione del volume, il materiale solido va delicatamente compattato, ad esempio picchiando sul contenitore per la misurazione. Se la sostanza in esame solida non è stata rimossa dall'occhio dell'animale da meccanismi fisiologici, al primo tempo di osservazione un'ora dopo il trattamento, si può sciacquare l'occhio con soluzione salina o acqua distillata.

1.4.2.3.3 *Saggio di aerosol*

Si raccomanda di raccogliere tutti gli spray e gli aerosol prima dell'instillazione nell'occhio. L'unica eccezione riguarda le sostanze in contenitori pressurizzati per aerosol, che non possono essere raccolte a causa della vaporizzazione. In questi casi l'occhio va tenuto aperto e la sostanza va somministrata nell'occhio con un unico spruzzo di circa un secondo, da una distanza di 10 cm, direttamente davanti all'occhio. La distanza può variare a seconda della pressione dello spray e del suo contenuto. Evitare di danneggiare l'occhio con la pressione dello spray. In alcuni casi può essere necessario valutare il potenziale di danno "meccanico" all'occhio dovuto alla forza dello spray.

È possibile ottenere una stima della dose di un aerosol simulando il saggio come segue: spruzzare la sostanza attraverso un'apertura delle dimensioni dell'occhio di un coniglio posta esattamente di fronte ad un foglio di carta. L'aumento di peso della carta viene usato quindi per approssimare la quantità spruzzata nell'occhio. Per le sostanze volatili, la dose può essere stimata pesando un contenitore ricevente prima e dopo la rimozione del materiale in esame.

1.4.2.4 *Saggio iniziale (saggio di irritazione/corrosione oculare in vivo su un solo animale)*

Come descritto nella strategia dei saggio sequenziali (cfr. Allegato 1), si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente il saggio *in vivo* usando un solo animale.

Se con la procedura descritta, i risultati di tale saggio indicano che la sostanza è corrosiva o gravemente irritante per l'occhio, non eseguire altri saggio di irritazione oculare.

1.4.2.5 *Anestetici locali*

È possibile applicare anestetici locali, valutandone la necessità caso per caso. Se l'analisi dell'importanza delle prove indica che la sostanza può provocare dolore, e se il saggio iniziale dimostra che si verificherà una reazione dolorosa, prima dell'instillazione della sostanza in esame si può applicare un anestetico locale. Il tipo, la concentrazione e la dose dell'anestetico locale vanno attentamente selezionati in modo da assicurare che il suo uso non modifichi la reazione alla sostanza in esame. Anche l'occhio di controllo va anestetizzato analogamente.

1.4.2.6 *Saggio di conferma (saggio di irritazione oculare in vivo con animali supplementari)*

Se nel saggio iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su un massimo di altri due animali. Se nel saggio iniziale è stato osservato un effetto fortemente irritante che indica un possibile effetto grave (irreversibile) si raccomanda di eseguire il saggio di conferma in maniera sequenziale su un solo animale per volta, anziché esporre contemporaneamente i due animali. Se il secondo animale rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, interrompere il saggio. È possibile che siano necessari altri animali per confermare le reazioni irritanti deboli o moderate.

1.4.2.7 *Periodo di osservazione*

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente l'entità e la reversibilità degli effetti osservati. Interrompere però l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni continui di dolore o sofferenza gravi (9). Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati di norma per 21 giorni successivamente alla somministrazione della sostanza in esame. In caso di reversibilità prima dei 21 giorni, interrompere subito l'esperimento.

1.4.2.7.1 Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni oculari

Gli occhi vanno esaminati a 1, 24, 48 e 72 ore dopo l'applicazione della sostanza in esame. Gli animali devono essere sottoposti a saggio per il tempo minimo necessario per ottenere informazioni definitive. Gli animali che presentano grave dolore o sofferenza vanno soppressi al più presto con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Sopprimere con metodi non cruenti gli animali che, dopo l'instillazione, presentano le seguenti lesioni oculari: perforazione corneale o ulcerazione corneale di rilievo, compreso stafiloma; sangue nella camera anteriore dell'occhio; opacità corneale di grado 4 che persista per 48 ore; assenza di riflesso pupillare alla luce (risposta dell'iride di grado 2) che persista per 72 ore; ulcerazione della membrana congiuntivale; necrosi della congiuntiva o della membrana nittitante; distacco epidermico. Tali lesioni sono infatti generalmente irreversibili.

Gli animali che non sviluppano lesioni oculari possono essere soppressi non prima di 3 giorni dopo l'instillazione. Gli animali con lesioni lievi o moderate vanno tenuti sotto osservazione fino alla scomparsa delle lesioni, oppure per 21 giorni, momento in cui lo studio si conclude. Effettuare le osservazioni nei giorni 7, 14 e 21, con l'obiettivo di determinare lo stato delle lesioni e la loro reversibilità o irreversibilità.

In occasione di ciascun esame, registrare i gradi della reazione oculare (congiuntiva, cornea e iride) (Tabella I). Annotare anche qualsiasi altra lesione dell'occhio (ad es. panno corneale, macchie) e qualsiasi effetto sistemico negativo.

L'esame delle reazioni può essere facilitato usando una lente binoculare, una lampada manuale a fessura, un biomicroscopio o altro dispositivo idoneo. Dopo aver registrato le osservazioni a 24 ore, è possibile esaminare ulteriormente gli occhi con l'ausilio di fluoresceina.

La classificazione delle reazioni oculari è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio utilizzato. La classificazione delle reazioni oculari va valutata in cieco.

2. **DATI**

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Valutare i punteggi dell'irritazione oculare insieme alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. I punteggi individuali non rappresentano uno standard assoluto per le proprietà irritanti di un materiale, in quanto si valutano anche altri effetti del materiale in esame. I punteggi individuali vanno invece considerati come valori di riferimento e hanno significato solo se corredati da una descrizione e una valutazione complete di tutte le osservazioni.

3. **RAPPORTO**

3.1 RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto deve contenere le seguenti informazioni:

Motivazione per il saggio *in vivo*: analisi dei dati relativi a saggio precedenti, compresi i risultati della strategia dei saggi sequenziali

- descrizione dei dati pertinenti disponibili da saggio precedenti;
- dati ricavati in ciascuna fase della strategia dei saggi;
- descrizione dei saggi *in vitro* eseguiti, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze in esame/di riferimento;
- descrizione dello studio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* eseguito, con i risultati ottenuti;
- analisi dell'importanza delle prove per l'esecuzione dello studio *in vivo*

Sostanza in esame:

- dati di identificazione (ad es. numero CAS, origine, purezza, impurità note, numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità, reattività con l'acqua);
- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;
- se si usa un anestetico locale, identificazione, purezza, tipo, dose e potenziale interazione con la sostanza in esame.

Eccipiente:

- identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;
- giustificazione della scelta dell'eccipiente.

Animali sperimentali:

- specie/ceppo usato, motivazione dell'uso di animali diversi dal coniglio albino;
- età di ciascun animale all'inizio dello studio;
- numero di animali di ciascun sesso nei gruppi sperimentali e di controllo (ove necessario);
- peso di ciascun singolo animale all'inizio e alla conclusione del saggio;
- origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.

Risultati:

- descrizione del metodo usato per assegnare un punteggio all'irritazione in ciascun momento di osservazione (ad es. lampada manuale a fessura, biomicroscopio, fluoresceina);
- tabulazione dei dati relativi alla reazione irritante/corrosiva per ciascun animale e in ciascun momento di osservazione fino al saggio alla fine del saggio
- descrizione del grado e della natura dell'irritazione o della corrosione osservata;
- descrizione di qualsiasi altra lesione osservata nell'occhio (ad es. vascolarizzazione, formazione di panno oculare, aderenze, macchie);
- descrizione degli eventuali effetti negativi non oculari locali e sistemici e degli eventuali reperti istopatologici.

Discussione dei risultati.

### 3.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'estrapolazione dei risultati degli studi sull'irritazione oculare negli animali da laboratorio agli esseri umani ha un valore solo limitato. In molti casi, il coniglio albino è più sensibile dell'uomo alle sostanze irritanti o corrosive per l'occhio.

È necessario interpretare con attenzione i dati per escludere l'irritazione dovuta a infezione secondaria.

4.

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Saggioing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise saggioing strategies ATLA 27, 161-177
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Saggioing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.
- (5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhtuter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro saggios for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483-524.
- (6a) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.
- (7) Metodo di prova B.4. Tossicità acuta: irritazione/corrosione cutanea.
- (8) OECD (1996) OECD Saggio Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Saggio Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/saggio/background.htm>).
- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Saggioing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/saggio/monos.htm>).

**TABELLA I: CLASSIFICAZIONE DELLE LESIONI OCULARI**

**Cornea**

Opacità: grado di densità (le misure vanno prese dalle zone più dense) (\*)

Assenza di ulcerazione e opacità .....	0
Zone di opacità sparse o diffuse (diverse dal lieve appannamento della normale lucentezza); dettagli dell'iride visibili chiaramente .....	1
Zone traslucide facilmente individuabili; dettagli dell'iride lievemente offuscati .....	2
Zona madreperlacea; nessun dettaglio visibile dell'iride; dimensioni della pupilla appena distinguibili .....	3
Cornea opaca; iride non distinguibile attraverso l'opacità .....	4

Massimo possibile: 4

(\*) Indicare l'area di opacità corneale

**Iride**

Normale .....	0
Rughe notevolmente approfondite, congestione, edema, moderata iperemia circumcorneale; oppure iniezione; iride reattiva alla luce (una reazione lenta è considerata positiva) .....	1
Emorragia, distruzione macroscopica, oppure assenza di reazione alla luce .....	2

Massimo possibile: 2

**Congiuntive**

Rossore (relativo alla congiuntiva palpebrale e bulbare; escluse cornea e iride)

Normale. ....	0
Alcuni vasi sanguigni iperemici (iniettati) .....	1
Colore cremisi diffuso; singoli vasi non facilmente distinguibili .....	2
Rosso acceso diffuso .....	3

Massimo possibile: 3

**Chemosi**

Edema (relativo alle palpebre e/o alle membrane nittitanti)

Normale .....	0
Edema appena superiore alla norma .....	1
Edema evidente, con parziale eversione delle palpebre .....	2
Edema, con palpebre semichiusure .....	3
Edema, con palpebre più che semichiusure .....	4

Massimo possibile: 4

—

## ALLEGATO

## Strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione oculari

## CONSIDERAZIONI

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, è importante evitare l'uso non necessario di animali e ridurre al minimo i saggi atti a provocare reazioni gravi. Valutare tutte le informazioni relative alla potenziale irritazione/corrosività oculare di una sostanza prima di prendere in considerazione i saggi *in vivo*. È possibile che esistano già prove sufficienti per classificare il potenziale di irritazione o corrosione oculare di una sostanza in esame, senza bisogno di effettuare saggi su animali da laboratorio. L'analisi dell'importanza delle prove e l'uso di una strategia dei saggi sequenziali ridurranno al minimo la necessità di eseguire saggi *in vivo*, soprattutto se è probabile che la sostanza provochi reazioni gravi.

Si raccomanda di svolgere un'analisi dell'importanza delle prove per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione oculare delle sostanze e determinare la necessità di altri studi, diversi da quelli *in vivo* sugli occhi, per meglio caratterizzare tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di applicare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze senza una documentazione sperimentale, usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati necessari al fine di valutarne la corrosività/irritazione oculare. La strategia dei saggi descritta nel presente Allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1) e successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), come approvato alla 28a riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2).

Questa strategia di saggio non è parte integrante del metodo di prova B.5, ma esprime l'approccio raccomandato per la determinazione delle proprietà di irritazione/corrosione oculare. Tale approccio rappresenta sia la migliore prassi che un punto di riferimento etico per l'esecuzione di saggi *in vivo* sull'irritazione/corrosione oculare. Il metodo di prova fornisce indicazioni su come eseguire il saggio *in vivo* e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione tale saggio. La strategia dei saggi sequenziali fornisce un metodo di analisi dell'importanza delle prove per la valutazione dei dati esistenti sulle proprietà di irritazione/corrosione oculare delle sostanze e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze sulle quali sono necessari ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. La strategia prevede dapprima l'esecuzione di saggi validati ed accettati *in vitro* o *ex vivo* e successivamente di studi di irritazione/corrosione cutanea in base al metodo di prova B.4 in circostanze specifiche (3)(4).

## DESCRIZIONE DELLA STRATEGIA DI SAGGIO "PER GRADI"

Prima di effettuare saggi nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali (Figura), valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di saggi oculari *in vivo*. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione sull'importanza delle prove valutare tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza in questione e dei suoi analoghi strutturali e giustificare tale decisione. Dare soprattutto importanza ai dati esistenti sulla sostanza riguardo a persone e animali, seguiti dal risultato dei saggi *in vitro* o *ex vivo*. Ove possibile, evitare gli studi *in vivo* delle sostanze corrosive. I fattori considerati nella strategia di saggio sono:

*Valutazione dei dati esistenti su soggetti umani e animali (Fase 1).* Considerare innanzi tutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi, e/o dati relativi a saggi su animali in studi sugli occhi), in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sugli occhi. Successivamente valutare i dati disponibili di studi su soggetti umani e/o animali sulla corrosione/irritazione cutanea. Non instillare negli occhi degli animali sostanze notoriamente corrosive o gravemente irritanti per l'occhio né sostanze che mostrano effetti corrosivi o irritanti sulla pelle; tali sostanze vanno considerate corrosive e/o irritanti anche per gli occhi. Non saggiare *in vivo* sugli occhi sostanze che in precedenti studi oculari hanno presentato prove sufficienti di non essere corrosive e di non avere potere irritante.

*Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2).* Prendere in considerazione i risultati dei saggi di sostanze chimiche strutturalmente correlate, ove disponibili. Quando sono disponibili dati su persone e/o animali riguardo a sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze sufficienti a indicarne il potenziale di corrosione/irritazione oculare, si può presumere che la sostanza in esame provocherà le stesse reazioni. In questi casi non è probabilmente necessario saggiare la sostanza. Dati negativi derivanti da studi di sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze non costituiscono una prova sufficiente di non corrosività/non potere irritante di una sostanza nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali. Per identificare il potenziale di corrosione e irritazione sia per gli effetti oculari che per quelli cutanei usare approcci SAR validati ed accettati.

*Proprietà fisicochimiche e reattività chimica (Fase 3).* Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es.  $\leq 2,0$  o  $\geq 11,5$ , possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per identificare una sostanza come corrosiva o irritante per gli occhi, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (5)(6). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza può non essere corrosiva per l'occhio, è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza un saggio *in vitro* o *ex vivo* validato ed accettato (cfr. punto Fasi 5 e 6).

*Considerazione di altre informazioni esistenti (Fase 4).* Valutare in questa fase tutte le informazioni disponibili sulla tossicità sistemica per via cutanea. Considerare anche la tossicità cutanea acuta della sostanza in esame. Se essa si è dimostrata molto tossica per via cutanea, può non essere necessario saggiarla sull'occhio. Sebbene non vi sia necessariamente un rapporto fra la tossicità cutanea acuta e l'irritazione/corrosione oculare, si può presumere che se una sostanza è molto tossica per via cutanea, presenterà anche elevata tossicità quando viene instillata nell'occhio. Questi dati possono essere valutati anche fra le fasi 2 e 3.

*Risultati dei saggi in vitro o ex vivo (Fasi 5 e 6).* Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in un saggio *in vitro* o *ex vivo* (7)(8) che è stato validato ed accettato per la valutazione specifica della corrosività/irritazione oculare o cutanea. Si può presumere che tali sostanze produrranno effetti analogamente gravi anche *in vivo*. Qualora non siano disponibili saggi *in vitro/ex vivo* validati ed accettati, si salteranno le Fasi 5 e 6 e si procederà direttamente alla Fase 7.

*Valutazione del potere irritante o della corrosività cutanea in vivo della sostanza (Fase 7).* Quando le prove esistenti non sono sufficienti ad effettuare un'analisi dell'importanza delle prove conclusiva della potenziale irritazione/corrosività oculare di una sostanza, sulla base dei dati degli studi sopra elencati, occorre valutare per prima cosa il potenziale di irritazione/corrosione cutanea *in vivo*, usando il metodo di prova B.4 (4) e il suo Allegato (9). Qualora si dimostri che la sostanza provoca corrosione o grave irritazione cutanea, essa va considerata un irritante oculare corrosivo, a meno che altre informazioni non vadano a sostegno di una conclusione alternativa. Pertanto, non è necessario eseguire un saggio oculare *in vivo*. Se la sostanza non è corrosiva o gravemente irritante per la pelle, va eseguito un saggio oculare *in vivo*.

*Saggio in vivo nei conigli (Fasi 8 e 9).* Gli studi oculari *in vivo* devono cominciare con un saggio iniziale su un solo animale. Se i risultati di questo saggio indicano che la sostanza è gravemente irritante o corrosiva per gli occhi, non si devono effettuare altri saggi. Se invece il saggio non rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, si esegue un saggio di conferma con altri due animali.

## BIBLIOGRAFIA

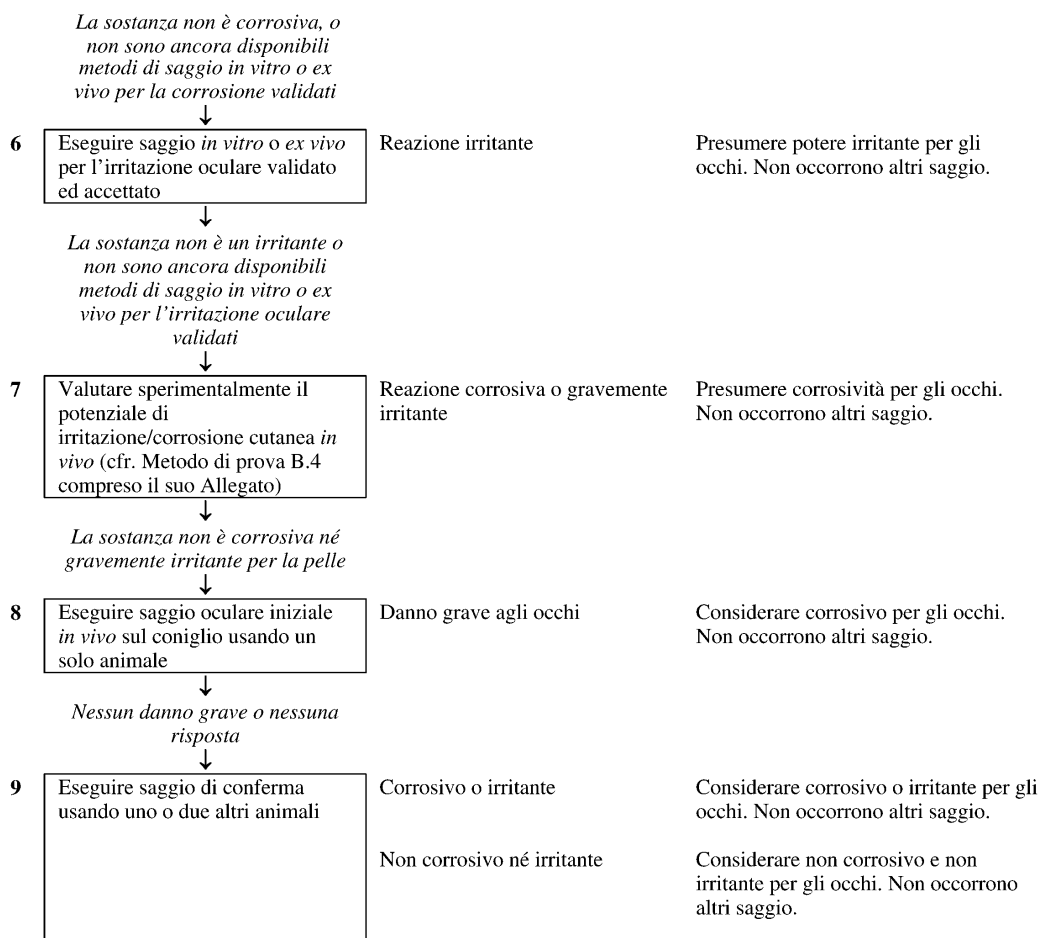
- (1) OECD (1996) OECD Saggio Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Saggio Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/saggio/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Saggioing Strategies. *ATLA* 27, 161-177.
- (4) Metodo di prova B.4. Tossicità acuta: irritazione/corrosione cutanea.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Saggioing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227-231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhtutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* saggios for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483-524.
- (8) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.
- (9) Allegato al metodo di prova B.4: Una strategia dei saggio sequenziali per l'irritazione e la corrosione cutanee.



FIGURA

STRATEGIA DI SAGGIO E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

	Attività	Reperto	Conclusione
1	Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino effetti sugli occhi	Danni gravi agli occhi	Endpoint apicale; considerare corrosivo per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Irritante per gli occhi	Endpoint apicale; considerare irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Non corrosivo/non irritante per gli occhi	Endpoint apicale; considerato non corrosivo e non irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
	Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino effetti corrosivi per la pelle	Corrosivo per la pelle	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
	Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino gravi effetti irritanti per la pelle	Gravemente irritante per la pelle	Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
	<i>Nessuna informazione disponibile, oppure le informazioni disponibili non sono conclusive</i>		
2	Eseguire SAR per la corrosione/irritazione oculare	Prevedere danni gravi agli occhi	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Prevedere irritazione degli occhi	Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Prevedere corrosività per la pelle	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
	<i>Non è possibile fare previsioni, oppure le previsioni non sono conclusive o sono negative</i>		
3	Misurare il pH (capacità tampone, se pertinente)	pH ≤ 2 o ≥ 11,5 (con elevata capacità tampone, se pertinente)	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
	<i>2 &lt; pH &lt; 11,5, or pH ≤ 2,0 o ≥ 11,5 con capacità tampone scarsa/nulla, se pertinente</i>		
4	Valutare tossicità sistemica per via cutanea	Molto tossico a concentrazioni che andrebbero saggiate nell'occhio.	La sostanza sarebbe troppo tossica per i saggio. Non occorrono saggio.
	<i>Tali informazioni non sono disponibili, oppure la sostanza non è molto tossica</i>		
5	Eseguire saggio <i>in vitro</i> o <i>ex vivo</i> per la corrosione oculare validato ed accettato	Reazione corrosiva	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono altri saggio.



pulizie della stanza, è bene puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di buio. Per quanto concerne l'alimentazione si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di assicurare un'adeguata miscelazione della sostanza di saggio, quando somministrata con il presente metodo.

Gli animali possono essere alloggiati individualmente o in piccoli gruppi dello stesso sesso. Le procedure di accoppiamento vanno effettuate in gabbie adeguate per tale scopo. Dopo comprovata copulazione, le femmine accoppiate vanno isolate in gabbie da parto o maternità. Anche i ratti accoppiati possono essere tenuti in piccoli gruppi, ma vanno separati uno o due giorni prima del parto. Quando si avvicina il momento del parto occorre fornire agli animali materiali specifici adeguati per la costruzione del nido.

### 1.3.3 Preparazione degli animali

Devono essere utilizzati animali giovani sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Gli animali del test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. È necessario conoscere eventuali relazioni di consanguineità in modo da evitare l'accoppiamento tra individui fratelli. Gli animali vanno assegnati a random ai gruppi di controllo e di trattamento (si raccomanda la stratificazione per peso corporeo). Le gabbie vanno sistemate in modo da ridurre al minimo i possibili effetti dovuti alla loro posizione. A ciascun animale va assegnato un numero identificativo unico. Per la generazione P l'assegnazione del numero identificativo deve avvenire prima dell'inizio della somministrazione delle dosi. Per la generazione F1 l'assegnazione va fatta allo svezzamento degli animali selezionati per l'accoppiamento. È necessario conservare la registrazione indicante la nidiata di origine per tutti gli animali F1 selezionati. Inoltre, si raccomanda l'identificazione individuale dei piccoli non appena possibile dopo la nascita nel caso si preveda la pesatura individuale degli stessi o l'esecuzione di eventuali test funzionali.

All'inizio della somministrazione delle dosi gli animali della generazione parentale (P) devono avere 5-9 settimane di età. Gli animali di tutti i gruppi sperimentali devono essere, per quanto praticamente possibile, di età e peso uniformi.

## 1.4 PROCEDURA

### 1.4.1 Numero e sesso degli animali

Ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve comprendere un numero sufficiente di animali da fornire idealmente non meno di 20 femmine gravide al parto o prossime al termine. Ciò può risultare impossibile in caso di somministrazione di sostanze che causano effetti indesiderati correlati al trattamento (ad esempio sterilità o eccessiva tossicità a dose elevata). L'obiettivo è di produrre un numero di gravidanze tale da assicurare un'analisi significativa del potenziale della sostanza in termini di effetti sulla fertilità, la gravidanza e il comportamento materno, oltre che la suzione, la crescita e lo sviluppo della prole F1, dal concepimento e fino alla maturità, per proseguire poi con gli effetti sullo sviluppo della prole della successiva generazione (F2) fino allo svezzamento. Comunque, il mancato ottenimento del numero desiderato di femmine gravide ( $\pm 20$ ) non invalida necessariamente lo studio e va valutato caso per caso.

### 1.4.2 Preparazione delle dosi

Si raccomanda di somministrare la sostanza di prova per via orale (assieme alla dieta o all'acqua potabile o mediante sonda gastrica), a meno che non si consideri più adeguata un'altra via di somministrazione (ad esempio cutanea o per inalazione).

Se necessario la sostanza di prova va disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Dei veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. È necessario determinare la stabilità della sostanza di prova nel veicolo.

### 1.4.3 Dosaggio

Si utilizzano almeno tre livelli di dose e un controllo corrispondente. A meno che la natura fisico-chimica o gli effetti biologici della sostanza di prova non impongano limiti in tal senso, il livello della dose più elevata va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità ma non provocare il decesso o gravi sofferenze. Di norma gli studi con un tasso di mortalità imprevista inferiore a circa il 10 % degli animali parentali (P) sono comunque accettabili. Per dimostrare eventuali effetti correlati al dosaggio e individuare il livello al quale non si osservano effetti avversi (NOAEL) occorre selezionare una sequenza decrescente di livelli di dose. In genere, per determinare i livelli decrescenti delle dosi risultano ottimali fattori compresi tra due e quattro e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che utilizzare intervalli molto ampi (ad esempio un fattore superiore a 10) fra i dosaggi. Per gli studi con somministrazione nella dieta, l'intervallo fra le dosi non deve superare un fattore di 3. I livelli delle dosi vanno selezionati tenendo conto di

eventuali dati sulla tossicità già disponibili, e in particolar modo dei risultati di studi con dosi ripetute. Occorre inoltre tenere conto di eventuali informazioni già disponibili sul metabolismo e la cinetica della sostanza di prova o di sostanze correlate. Questi dati contribuiranno altresì a dimostrare l'adeguatezza del regime di dosaggio.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato o trattato solo con il veicolo nel caso si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza di saggio. Tranne per la somministrazione della sostanza di saggio, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in maniera identica ai soggetti del gruppo di trattamento. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo riceverà il veicolo al volume più elevato in uso nel test. Se una sostanza di prova viene somministrata mediante la dieta e causa una riduzione dell'apporto o dell'utilizzo degli alimenti, può diventare necessario l'impiego di un gruppo di controllo pair-fed. In alternativa è possibile usare i dati da studi controllati disegnati per valutare gli effetti della diminuzione del consumo di cibo sui parametri della riproduzione al posto di un gruppo di controllo pair-fed concomitante.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di altri additivi: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; infine, effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

#### 1.4.4 Test limite

Se uno studio orale a un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg per peso corporeo/die o, per somministrazione tramite l'alimentazione o l'acqua potabile, a una percentuale equivalente nella dieta o nell'acqua potabile secondo le procedure descritte per questo studio non produce effetti tossici osservabili, sia negli animali parentali sia nella prole e se, sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente e/o metabolicamente correlate, non ci si attende tossicità, allora può non essere considerato necessario uno studio completo con livelli di dosi differenti. Si applica il test limite, tranne quando l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dose orale più elevato. Per altri tipi di somministrazione, quali l'inalazione o l'applicazione cutanea, sono spesso le proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio, come la solubilità, a indicare e limitare il livello massimo di esposizione raggiungibile.

#### 1.4.5 Somministrazione delle dosi

Occorre somministrare la sostanza di prova agli animali per 7 giorni alla settimana, di preferenza per via orale (dieta, acqua potabile o sonda gastrica). In caso di utilizzo di un'altra via di somministrazione, occorre giustificare tale scelta ed eventualmente apportare modifiche adeguate al test. Tutti gli animali saranno trattati per la stessa via di somministrazione nel corso di un periodo sperimentale adeguato. Se la sostanza di saggio viene somministrata mediante sonda, deve trattarsi di una sonda gastrica. Il volume di liquidi somministrati in una volta non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo (0,4 ml/100 g di peso corporeo è il massimo per l'olio di semi di mais), tranne che nel caso di soluzioni acquose in cui è consentito usare 2 ml/100 g. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che generalmente manifestano effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume di prova, regolando la concentrazione, in modo da assicurare un volume costante a tutti i livelli di dose. Negli studi con sonda gastrica normalmente i piccoli ricevono la sostanza solo indirettamente, attraverso il latte, finché non comincia il dosaggio diretto al momento dello svezzamento. Negli studi che prevedono la somministrazione nella dieta o nell'acqua potabile in genere i piccoli ricevono la sostanza di saggio anche direttamente quando cominciano ad alimentarsi da soli durante l'ultima settimana del periodo di allattamento.

Per quanto concerne le sostanze somministrate tramite il cibo o l'acqua potabile, è importante fare in modo che le quantità di sostanza di saggio impiegate non interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio idrico. Se la sostanza di saggio viene somministrata con la dieta, è possibile usare una concentrazione alimentare costante (ppm) o un livello costante di dosi rispetto al peso corporeo degli animali; occorre specificare l'opzione utilizzata. Nel caso di sostanze somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca negli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali. Nel regolare le dosi per la sonda gastrica in base al peso occorre tenere conto dei dati sulla distribuzione nella placenta.

#### 1.4.6 Programma sperimentale

La somministrazione giornaliera delle dosi ai maschi e alle femmine della generazione parentale (P) deve iniziare a 5-9 settimane di età. La somministrazione giornaliera ai maschi e alle femmine F1 deve iniziare allo svezzamento; occorre ricordare che, in caso di somministrazione della sostanza di saggio tramite la dieta o l'acqua potabile, l'esposizione diretta dei piccoli F1 alla sostanza di saggio può avvenire già durante il periodo dell'allattamento. Per entrambi i sessi di entrambe le generazioni (P e F1) la somministrazione proseguirà per almeno 10 settimane prima del periodo di accoppiamento e andrà continuata, in entrambi i sessi, durante le 2 settimane del periodo di accoppiamento. I maschi vanno sacrificati con metodi non cruenti ed esaminati quando non sono più necessari per la valutazione degli effetti sulla riproduzione. Per quanto riguarda le femmine parentali (P), il dosaggio va continuato per tutta la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F1. Occorre eventualmente modificare il programma di somministrazione sulla base

delle informazioni disponibili circa la sostanza di saggio, compresi dati già esistenti di tossicità, induzione del metabolismo o bioaccumulo. Di norma la dose somministrata a ciascun animale deve essere basata sulla più recente determinazione individuale del peso corporeo. Occorre tuttavia usare cautela nel regolare la dose durante l'ultimo periodo della gravidanza.

Il trattamento di maschi e femmine delle generazioni P e F1 va proseguito fino alla soppressione. Tutti i maschi e le femmine adulti P e F1 vanno sacrificati con metodi non cruenti quando non sono più necessari per la valutazione degli effetti sulla riproduzione. La prole F1 non selezionata per l'accoppiamento e tutta la prole F2 vanno sacrificate con metodi non cruenti dopo lo svezzamento.

1.4.7 **Procedura di accoppiamento**

1.4.7.1 *Accoppiamento parentale (P)*

Per ogni accoppiamento, ciascuna femmina viene posta insieme a un unico maschio dello stesso livello di dose (accoppiamento 1:1) finché non avviene la copulazione o finché non sono trascorse 2 settimane. Occorre esaminare ogni giorno le femmine alla ricerca di spermatozoi o tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si rileva la presenza di un tappo vaginale o di spermatozoi. Nel caso l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo. Le coppie in cui è avvenuta la copulazione vanno identificate chiaramente in sede di registrazione dei dati. Occorre evitare l'accoppiamento fra consanguinei.

1.4.7.2 *Accoppiamento della generazione F1*

Per l'accoppiamento della prole F1 occorre selezionare, allo svezzamento, almeno un maschio e una femmina da ciascuna nidiata per farli accoppiare con altri piccoli dello stesso livello di dose, ma di una nidiata diversa, allo scopo di produrre la generazione F2. Se non si osservano differenze significative nel peso corporeo o nell'aspetto dei potenziali partner, la selezione dei piccoli da ciascuna nidiata va effettuata a random. Nel caso in cui si osservino differenze, vanno selezionati i migliori rappresentanti di ciascuna nidiata. Di prassi, il modo migliore per farlo è basarsi sul peso corporeo, sebbene l'aspetto possa risultare un parametro più adeguato. La prole F1 non va fatta accoppiare prima del raggiungimento della piena maturità sessuale.

Le coppie senza progenie vanno analizzate per determinare la causa apparente dell'infertilità. In tal caso può rendersi necessario ricorrere a determinate procedure, tra cui la ripetizione dell'accoppiamento con altri maschi o femmine di comprovata capacità riproduttiva, l'esame microscopico degli organi riproduttori e l'esame dei cicli estrali o della spermatogenesi.

1.4.7.3 *Secondo accoppiamento*

Qualora si riscontri una deviazione dalla norma nel numero di esemplari di una nidiata correlabile al trattamento o qualora si osservino effetti inusitati nel corso del primo accoppiamento, si raccomanda di far accoppiare una seconda volta gli adulti delle generazioni P o F1 per produrre una seconda nidiata. Per le femmine o i maschi che non hanno prodotto piccoli è consigliabile il riaccoppiamento con riproduttori comprovati del sesso opposto. Se si ritiene necessaria la produzione di una seconda nidiata da parte di una delle generazioni, gli animali vanno fatti riaccoppiare all'incirca una settimana dopo lo svezzamento della nidiata precedente.

1.4.7.4 *Dimensioni della nidiata*

Occorre permettere agli animali di figliare normalmente e di allevare la prole fino allo svezzamento. La standardizzazione del numero di individui delle nidiate è facoltativa. Nel caso venga eseguita, occorre descrivere in modo particolareggiato il metodo utilizzato.

1.5 OSSERVAZIONI

1.5.1 **Osservazioni cliniche**

Occorre eseguire ogni giorno osservazioni cliniche generali e, nel caso di somministrazione mediante sonda gastrica, tale esame va programmato tenendo conto del previsto periodo di picco degli effetti dopo la somministrazione. Sono da registrare i cambiamenti del comportamento, i segni di parto difficoltoso o prolungato e tutti i segni di tossicità. È necessario eseguire un ulteriore esame più dettagliato su ciascun animale a intervalli almeno settimanali, ad esempio da svolgersi in occasione di una pesatura dell'animale. Due volte al giorno, o eventualmente una volta al giorno durante il fine settimana, occorre valutare tutti gli animali in relazione alla morbilità e alla mortalità.

1.5.2 **Peso corporeo e consumo di cibo/acqua degli animali parentali**

Gli animali delle generazioni parentali (P e F1) vanno pesati il primo giorno della somministrazione e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Le femmine parentali (P e F1) vanno pesate almeno nei giorni 0, 7, 14 e 20 o 21 di gestazione, nonché durante l'allattamento negli stessi giorni di pesatura dei cuccioli e nel giorno della soppressione degli animali. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto. Durante il periodo precedente all'accoppiamento e quello di gestazione il consumo di cibo va registrato con cadenza almeno settimanale. Se la sostanza di saggio viene somministrata nell'acqua, il consumo di acqua va registrato con cadenza almeno settimanale.

1.5.3 **Ciclo estrale**

La lunghezza e la normalità del ciclo estrale vanno valutate nelle femmine P e F1 mediante striscio vaginale prima dell'accoppiamento, nonché facoltativamente durante l'accoppiamento, finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non arrecare disturbo alla mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogavidanza (1).

1.5.4 **Parametri relativi agli spermatozoi**

Al momento della soppressione occorre registrare il peso di testicoli ed epididimi di tutti i maschi P e F1, riservando un esemplare di ciascun organo per l'esame istopatologico (vedi sezioni 1.5.7 e 1.5.8.1). In una subserie di almeno dieci maschi di ciascun gruppo di maschi delle generazioni P e F1, i testicoli e gli epididimi restanti sono da utilizzare rispettivamente per la conta degli spermatici resistenti all'omogeneizzazione e delle riserve di spermatozoi nella coda dell'epididimo. Per la stessa subserie di maschi occorre raccogliere gli spermatozoi dalla coda dell'epididimo o dal vaso deferente allo scopo di valutarne la motilità e la morfologia. Se si osservano effetti correlati al trattamento o se da altri studi emergono prove di possibili effetti sulla spermatogenesi, la valutazione degli spermatozoi va eseguita su tutti i maschi di ciascun gruppo; diversamente, è possibile limitare la conta ai maschi P e F1 di controllo e del gruppo di trattamento alla dose più elevata.

È necessario contare il numero totale degli spermatici testicolari resistenti all'omogeneizzazione e degli spermatozoi della coda dell'epididimo (2)(3). Le riserve caudali di spermatozoi possono essere calcolate in base alla concentrazione e al volume degli spermatozoi nella sospensione usata per eseguire le valutazioni qualitative e in base al numero di spermatozoi rinvenuti mediante successiva triturazione e/o omogeneizzazione del restante tessuto caudale. La conta va eseguita sulla subserie selezionata di maschi di tutti i gruppi di dosaggio immediatamente dopo la soppressione degli animali, a meno che non si eseguano registrazioni video o digitali o salvo in caso di congelamento degli esemplari per esame successivo. In questi casi è possibile analizzare anzitutto i controlli e il gruppo alla dose più elevata. Se non si rilevano effetti correlati al trattamento (ad es. effetti sulla conta, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi) non occorre procedere all'analisi degli altri gruppi. Se nel gruppo che ha ricevuto la dose più elevata si osservano effetti correlati al trattamento, è necessario analizzare anche i gruppi delle dosi inferiori.

La motilità degli spermatozoi dell'epididimo (o del vaso deferente) va valutata o videoregistrata immediatamente dopo aver sacrificato gli animali. Occorre recuperare gli spermatozoi riducendo al minimo il danno e diluirli, per l'analisi della motilità, usando metodi accettabili (4). La percentuale di spermatozoi progressivamente mobili va determinata soggettivamente od oggettivamente. Se si esegue l'analisi computerizzata del movimento (5)(6)(7)(8)(9)(10) il calcolo della mobilità progressiva si basa su soglie definite dall'utente per la velocità media sul percorso e l'avanzamento in linea retta o indice lineare. Se si esegue una videoregistrazione dei campioni (11) o le immagini vengono registrate in altro modo al momento dell'autopsia, è sufficiente procedere solo all'analisi dei maschi P e F1 di controllo e della dose più elevata, a meno che non si osservino effetti correlati al trattamento; in tal caso vanno esaminati anche i gruppi delle dosi inferiori. In assenza di immagini video o digitali, vanno analizzati mediante autopsia tutti i campioni di tutti i gruppi di trattamento.

È necessario eseguire una valutazione morfologica di un campione di spermatozoi dell'epididimo (o del vaso deferente). Gli spermatozoi (ad esempio 200) vanno esaminati come preparazioni fisse e umide (12) e classificati come normali o anomali. Esempi di anomalie morfologiche degli spermatozoi sono fusione, teste isolate e malformazioni di testa e/o coda. La valutazione va eseguita sulla subserie selezionata dei maschi di ciascun gruppo di dose subito dopo la soppressione degli animali o, in caso di registrazioni video o digitali, in un secondo momento. Gli strisci, una volta fissati, possono anch'essi essere letti in un

momento successivo. In questi casi è possibile analizzare anzitutto i controlli e il gruppo della dose più elevata. Se non si rilevano effetti correlati al trattamento (ad esempio effetti sulla morfologia degli spermatozoi) non occorre procedere all'analisi degli altri gruppi. Se nel gruppo della dose più elevata si osservano effetti correlati al trattamento, è necessario analizzare anche i gruppi delle dosi inferiori.

Qualora uno o più parametri di valutazione degli spermatozoi di cui sopra siano già stati esaminati nell'ambito di uno studio sulla tossicità sistemica della durata di almeno 90 giorni, non occorre ripeterli nello studio su due generazioni. Si raccomanda, tuttavia, di conservare campioni o registrazioni digitali degli spermatozoi della generazione P per consentire un'eventuale valutazione successiva.

1.5.5 **Prole**

Ciascuna nidiata va esaminata non appena possibile dopo il parto (giorno di allattamento 0) per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, distinguere gli individui nati morti da quelli nati vivi e individuare eventuali anomalie macroscopiche. I piccoli trovati morti il giorno 0 dovrebbero, se non sono in stato di decomposizione, essere esaminati alla ricerca di possibili difetti e della causa del decesso e preparati per la conservazione. I piccoli vivi dovrebbero essere contati e pesati individualmente alla nascita (giorno di allattamento 0) o il giorno 1, e successivamente ad intervalli regolari, ad esempio nei giorni 4, 7, 14 e 21 dell'allattamento. È importante registrare eventuali anomalie fisiche o comportamentali osservate nelle madri o nella prole.

Lo sviluppo fisico della prole va registrato soprattutto in termini di aumento del peso corporeo. Altri parametri fisici (ad esempio l'apertura di orecchie e occhi, l'eruzione dei denti, la crescita del pelo) possono fornire informazioni supplementari, ma è preferibile valutare questo tipo di dati alla luce di quelli sulla maturazione sessuale (ad esempio età e peso corporeo all'apertura vaginale o alla separazione balano-prepuziale) (13). Si raccomanda di eseguire indagini sulla funzionalità in generale (ad esempio attività motoria, funzioni sensoriali, ontogenesi dei riflessi) della prole F1 prima e/o dopo lo svezzamento, in particolare per le funzioni correlate alla maturazione sessuale, se tali indagini non sono comprese in studi separati. Degli animali F1 svezzati e selezionati per l'accoppiamento occorre determinare l'età al momento dell'apertura vaginale e della separazione prepuziale. La distanza anogenitale va misurata al giorno 0 dalla nascita nei piccoli F2, se ciò risulta indicato per la presenza di alterazioni nel rapporto tra i due sessi o nei tempi di maturazione sessuale della generazione F1.

Le osservazioni sulla funzionalità possono essere omesse nei gruppi che rivelano altri chiari segni di effetti negativi (ad esempio un rallentamento significativo dell'aumento ponderale, ecc.). Se effettuate, le indagini sulla funzionalità non devono riguardare i piccoli selezionati per l'accoppiamento.

1.5.6 **Esame autoptico macroscopico**

Al momento della soppressione o dell'eventuale decesso di esemplari nel corso dello studio è necessario eseguire un esame autoptico macroscopico per determinare eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche su tutti gli animali parentali (P e F1), tutti i piccoli con anomalie visibili o segni clinici, oltre che su un piccolo di ciascun sesso di ogni nidiata selezionato a random, sia della generazione F1 che della F2. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttore. I piccoli moribondi che vengono sacrificati con modalità non cruenta e i piccoli deceduti, quando non in stato di decomposizione, vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e/o della causa del decesso e successivamente conservati.

Occorre esaminare l'utero di tutte le femmine primipare, evitando di compromettere l'esame istopatologico, per determinare la presenza e il numero dei siti di impianto.

1.5.7 **Peso degli organi**

Al momento della soppressione occorre determinare il peso corporeo e il peso dei seguenti organi di tutti gli animali delle generazioni parentali P e F1 (gli organi pari vanno pesati individualmente):

- utero, ovaie;
- testicoli, epididimi (totali e coda);
- prostata;

- vescicole seminali con ghiandole della coagulazione e i relativi liquidi oltre che la prostata (come un'unica unità);
- cervello, fegato, reni, milza, ghiandole pituitaria, tiroide e surrenali e organi bersaglio noti.

Al momento della soppressione dei piccoli F1 e F2 selezionati per l'esame autoptico si procede alla determinazione del peso corporeo raggiunto alla fine dell'esperimento (vedi sezione 1.5.6). Di ciascun piccolo, di entrambe i sessi da ciascuna nidiata selezionato a random, alla pesatura dei seguenti organi: cervello, milza e timo.

I risultati dell'autopsia macroscopica e della pesatura degli organi vanno valutati, quando possibile, in rapporto alle osservazioni fatte in altri studi con dose ripetuta.

### 1.5.8 Istopatologia

#### 1.5.8.1 *Animali parentali*

I seguenti organi e tessuti degli animali delle generazioni parentali (P e F1), o loro campioni rappresentativi, devono essere fissati e conservati in un mezzo adeguato per l'esame istopatologico:

- vagina, utero con cervice e ovaie (conservati in un fissativo appropriato);
- un testicolo (conservato in soluzione di Bouin o in un fissativo analogo), un epididimo, vescicole seminali, prostata e ghiandola della coagulazione;
- organi bersaglio precedentemente identificati di tutti gli animali P e F1 selezionati per l'accoppiamento.

L'esame istopatologico completo degli organi e dei tessuti conservati sopra elencati va eseguito su tutti gli animali P e F1 della dose elevata e di controllo selezionati per l'accoppiamento. L'esame delle ovaie degli animali P è facoltativo. Gli organi che evidenziano alterazioni correlate al trattamento vanno esaminati anche nei gruppi alla dose bassa ed intermedia, allo scopo di contribuire alla determinazione del NOAEL. Inoltre, vanno sottoposti ad esame istopatologico gli organi della riproduzione degli animali dei gruppi di trattamento alla dose bassa ed intermedia nei quali si sospetta una riduzione della fertilità (ad esempio gli esemplari che non si sono accoppiati, che non hanno concepito, che non hanno generato o che non hanno partorito prole sana, o nei quali si sono osservati effetti sul ciclo estrale o sul numero, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi). Devono essere esaminate tutte le lesioni macroscopiche, quali atrofie e tumori.

L'esame istopatologico dettagliato dei testicoli (trattati ad esempio mediante fissativo di Bouin, inclusi in paraffina e preparati in sezioni trasversali di 4-5 µm di spessore) va effettuato allo scopo di identificare eventuali effetti correlati al trattamento, quali ritenzione di spermatidi, mancanza di strati o tipi di cellule germinali, formazione di cellule giganti polinucleate o spostamento delle cellule spermatogeniche nel lume (14). L'esame degli epididimi intatti deve comprendere testa, corpo e coda e può essere eseguito mediante valutazione di una sezione longitudinale. Occorre valutare la presenza di infiltrazioni leucocitarie, alterazioni della prevalenza dei tipi cellulari, tipi cellulari aberranti e fagocitosi degli spermatozoi nell'epididimo. Per l'esame degli organi della riproduzione maschili può essere impiegata la colorazione con PAS ed ematossilina.

Dopo l'allattamento l'ovaio deve contenere follicoli primordiali e in crescita, oltre ai grandi corpi lutei della lattazione. L'esame istopatologico deve individuare un deterioramento qualitativo della popolazione di follicoli primordiali. Nelle femmine F1 occorre effettuare un'analisi quantitativa dei follicoli primordiali; il numero di animali, la selezione delle sezioni ovariche e le dimensioni dei campioni devono essere statisticamente adeguati alla procedura di analisi applicata. L'esame deve comprendere la conta del numero dei follicoli primordiali che può essere combinata con i follicoli piccoli in crescita per il confronto delle ovaie tra soggetti trattati e i controlli (15)(16)(17)(18)(19).

#### 1.5.8.2 *Animali svezzati*

I tessuti e gli organi bersaglio che presentano evidenti irregolarità nei piccoli con anomalie esterne o segni clinici, oltre a quelli di un individuo di ciascun sesso di ogni nidiata scelto a random, sia della generazione F1 che della F2, che non sono stati selezionati per l'accoppiamento, devono essere fissati e conservati in mezzo adeguato per l'esame istopatologico. Occorre effettuare una caratterizzazione istopatologica completa del tessuto conservato con particolare attenzione per gli organi dell'apparato riproduttore.



2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati vanno riportati individualmente e riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo sperimentale e ciascuna generazione il numero di animali presenti all'inizio del test, il numero di animali trovati morti durante il test o soppressi per motivi umanitari, il momento di eventuali decessi o soppressioni con metodi non cruenti, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di osservazione sugli animali parentali e sulla prole, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate.

È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettato; i metodi statistici vanno selezionati come parte del disegno sperimentale e devono essere giustificati. Per l'analisi dei dati possono risultare utili i modelli statistici dose-risposta. La relazione deve comprendere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma software utilizzati, di modo che un revisore o un esperto di statistica indipendente possa rivalutare e ricostruire l'analisi.

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del presente studio di tossicità riproduttiva a due generazioni vanno valutati in base agli effetti osservati, ai reperti delle autopsie e all'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto, o la sua assenza, fra la dose della sostanza di saggio e la presenza o assenza, incidenza e gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, le conseguenze sulla fertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici. Nella valutazione dei risultati del test occorre tenere conto delle proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio e, quando disponibili, dei dati sulla sua tossicocinetica.

Un test di tossicità riproduttiva adeguatamente condotto deve fornire una stima soddisfacente del livello di dose al quale non si osservano effetti e consentire di capire gli effetti negativi sulla riproduzione, sul parto, sull'allattamento, sullo sviluppo postnatale, sulla crescita e sullo sviluppo sessuale.

2.3 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uno studio di tossicità riproduttiva a due generazioni deve fornire informazioni sugli effetti dovuti all'esposizione ripetuta ad una sostanza durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo. In particolare, un simile studio fornisce informazioni sui parametri relativi alla riproduzione e sullo sviluppo, la crescita, la maturazione e la sopravvivenza della prole. I risultati dello studio vanno interpretati insieme ai dati ottenuti con studi subcronici, sullo sviluppo prenatale, di tossicocinetica e altri studi disponibili. I risultati di questo studio possono essere impiegati per valutare la necessità di sottoporre a ulteriori test una determinata sostanza chimica. L'estrapolazione all'uomo dei risultati dello studio è valida solo limitatamente. Tali risultati si prestano piuttosto per trarre informazioni sui livelli di dose ai quali non si rilevano effetti e sui livelli di esposizione accettabile per l'uomo (20)(21)(22)(23).

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza di saggio:

- natura fisica e, se pertinenti, proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi;
- purezza.

Veicolo (se pertinente):

- giustificazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

- specie/ceppo;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di alloggio, dieta, materiali per la lettiera, ecc.;
- peso individuale degli animali all'inizio del test.

Condizioni del test:

- motivazione per la selezione del livello delle dosi;
- dettagli sulla formulazione/preparazione della sostanza di saggio somministrata nella dieta; concentrazioni ottenute;
- stabilità e omogeneità della preparazione;
- dettagli sulla somministrazione della sostanza di saggio;
- conversione dalla concentrazione della sostanza di saggio in dieta/acqua potabile (ppm) alla dose ottenuta (mg/kg peso corporeo/die), se pertinente;
- dettagli circa la qualità di cibo e acqua.

Risultati:

- consumo di cibo e di acqua (se disponibile), efficienza di trasformazione alimentare (incremento ponderale per grammo di cibo assunto), consumo della sostanza di saggio per gli animali P e F1, tranne che per il periodo di coabitazione e per almeno l'ultimo terzo dell'allattamento;
- dati sull'assorbimento (se disponibili);
- dati sul peso corporeo per gli animali P e F1 selezionati per l'accoppiamento;
- dati sul peso corporeo degli individui singoli e delle intere nidiate;
- peso corporeo al momento della soppressione degli animali e dati sul peso assoluto e relativo degli organi negli animali parentali;
- natura, gravità e durata dei segni clinici (reversibili o meno);
- momento del decesso durante lo studio o indicazione degli animali sopravvissuti fino alla conclusione del test;
- dati sulla risposta tossica per sesso e dose, ivi compresi gli indici di accoppiamento, fertilità, gestazione, nascita, vitalità e allattamento; la relazione deve indicare i numeri utilizzati per calcolare questi indici;
- effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.;
- reperti delle autopsie;
- descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici;
- numero di femmine P e F1 con cicli normali e lunghezza dei cicli;
- numero totale degli spermatozoi nella coda dell'epididimo, percentuale di spermatozoi progressivamente mobili, percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e percentuale di spermatozoi con ciascuna delle anomalie identificate;
- tempo di maturazione per l'accoppiamento, compreso il numero di giorni fino all'accoppiamento;
- durata della gestazione;

- numero di impianti, corpi lutei, numero di esemplari per nidata;
- numero di nati vivi e di perdite post-impianto;
- numero di piccoli con anomalie evidenti; numero di esemplari più piccoli del normale (se determinato);
- dati sui punti di repere fisici nei piccoli e altri dati sullo sviluppo postnatale; i punti di repere fisici valutati vanno giustificati;
- dati sulla funzionalità in piccoli e adulti, per quanto pertinenti;
- trattamento statistico dei risultati, se pertinente.

Discussione dei risultati.

Conclusioni, compresi i valori NOAEL per gli effetti sulle madri e sulla prole.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproductions in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237-244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorohydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10:401-415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298-303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.

- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
- (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.»

## ALLEGATO I

## «B.40. CORROSIONE CUTANEA

1. **METODO**1.1. **Introduzione**

Il Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (CECMA) del Centro comune di ricerca della Commissione europea ha confermato la validità scientifica di due saggi in vitro per determinare la corrosività cutanea di determinate sostanze. Trattasi del saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto (TER, transcutaneous electrical resistance) e di un saggio che utilizza un modello di cute umana (1) (2) (3). Lo studio di convalida del CECMA ha dimostrato che entrambi i metodi consentono di distinguere adeguatamente le sostanze che notoriamente sono corrosive per la pelle da quelle non corrosive. Inoltre, il protocollo del saggio che utilizza un modello di cute umana consente di distinguere i diversi gradi degli effetti corrosivi (agenti noti per essere estremamente corrosivi, R35 e altri agenti corrosivi, R34) (2). Di entrambi i saggi sono fornite la descrizione e le procedure. La scelta del saggio da utilizzare è dettata dai requisiti specifici e dalle preferenze dell'utilizzatore.

Cfr. anche la parte B nell'introduzione generale.

1.2. **Definizioni**

*corrosione cutanea*: produzione di danni irreversibili al tessuto cutaneo a seguito dell'applicazione di un materiale da saggiare.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna specifica, ma cfr. i punti 1.5.3.4 e 1.7.2.3.

1.4. **Principio del metodo di saggio — Saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto**

Il materiale di saggio è applicato per un massimo di 24 ore alle superfici epidermiche di lembi di cute di forma circolare (dischi) ottenuti dal mantello di giovani ratti sacrificati in maniera non cruenta. I materiali corrosivi sono identificati in base alla loro capacità di intaccare la normale integrità dello strato corneo e della sua funzione protettiva in termini di riduzione della normale resistenza elettrica transcutanea (TER) al di sotto di un determinato livello soglia (5 kΩ) (4) (5). I materiali irritanti e non irritanti non riducono la TER al di sotto del livello soglia. Il saggio può comprendere anche una valutazione della capacità di legame con colorante per saggiare i surfattanti e le sostanze organiche neutre [per una definizione cfr. la voce bibliografica (6)] allo scopo di ridurre il numero dei risultati di falso positivo ottenuti specificatamente con questi tipi di sostanze chimiche (2) (7).

1.5. **Descrizione del metodo di saggio — Saggio di resistenza elettrica transcutanea della pelle di ratto**1.5.1. *Animali*

Per la preparazione dei dischi cutanei vengono utilizzati giovani ratti (ratti Wistar o un ceppo equivalente di 20-23 giorni). Con un'apposita tosatrice viene rimosso il pelo della parte dorsale e laterale dell'animale. L'animale viene quindi accuratamente strofinato e lavato lungo il dorso e i fianchi tenendo la parte tosata immersa in una soluzione antibiotica (contenente per esempio streptomicina, penicillina, cloramfenicolo e anfotericina in concentrazioni tali da inibire la proliferazione dei batteri). Dopo 3-4 giorni si procede ad un ulteriore lavaggio con antibiotici. Gli animali così trattati devono essere utilizzati entro tre giorni al massimo (per la produzione dei preparati cutanei gli animali non devono aver superato il 31° giorno di vita).

1.5.2. *Preparazione dei lembi cutanei*

Gli animali vengono sacrificati con un metodo non cruento. Si procede quindi alla rimozione della parte dorsale della cute e all'accurata eliminazione di tutto il grasso in eccesso. Il lembo cutaneo così ottenuto viene posizionato sull'estremità di una provetta in PTFE (politetrafluoroetilene) in modo che la superficie epidermica sia a contatto con la provetta, viene quindi fissato all'estremità della provetta mediante una ghiera inserita a pressione ed infine vengono eliminati gli orli di pelle debordante. La figura 1 indica le dimensioni della provetta e della ghiera. Infine la ghiera viene accuratamente saldata all'estremità della provetta mediante gelatina di petrolio. La provetta viene fissata mediante una pinza a molla e quindi introdotta in un recipiente contenente una soluzione di magnesio solfato (154mM) (figura 2).

1.5.3. *Procedura*1.5.3.1. *Applicazione del materiale di saggio*

Le sostanze da saggiare in forma liquida (150µl) vengono applicate alla superficie epidermica all'interno della provetta (figura 2). Per il saggio di materiali solidi la sostanza è applicata in quantità sufficiente al disco cutaneo in modo da coprire l'intera superficie dell'epidermide. Si aggiunge acqua deionizzata (150µl) sulla parte superiore del materiale solido ed infine si agita lievemente la provetta. Le sostanze da saggiare dovrebbero entrare in contatto con la cute il più possibile. A tale scopo, nel caso di alcuni materiali solidi occorre procedere a fusione della sostanza da saggiare innalzando la temperatura ad un massimo di 30°C, oppure macinando la sostanza fino a produrne un granulato o una polvere.

Per ciascuna sostanza da saggiare vengono utilizzati tre dischi cutanei. L'applicazione dura 24 ore (cfr. anche 1.5.3.4). La sostanza viene quindi completamente rimossa mediante lavaggio sotto un getto di acqua corrente ad una temperatura di 30 °C al massimo. Per facilitare l'eliminazione delle sostanze da saggiare che si sono solidificate all'interno della provetta si procede a lavaggio sotto acqua corrente a 30 °C circa.

#### 1.5.3.2. Misurazione della TER

La TER viene misurata utilizzando un ponte dati a corrente alternata a basso voltaggio (ad esempio AIM 401 oppure 6401 o equivalente). Prima di misurare la resistenza elettrica viene ridotta la tensione di superficie della cute aggiungendo etanolo al 70% in quantità tale da coprire l'intera epidermide. Dopo alcuni secondi si procede alla rimozione dell'etanolo mediante inversione della provetta e in seguito all'idratazione del tessuto per mezzo di una soluzione di 3ml di magnesio solfato (154mM). Per misurare la resistenza in kΩ/disco si posizionano gli elettrodi del ponte dati su entrambi i lati del disco (figura 2). La figura 1 mostra le dimensioni degli elettrodi e la lunghezza della parte dell'elettrodo che rimane al di sotto delle pinze a coccodrillo. Nel corso della misurazione la molletta di fissaggio dell'elettrodo interno (il più spesso) viene collocata sull'estremità superiore della provetta affinché una buona parte dell'elettrodo rimanga immersa nella soluzione di magnesio solfato. L'elettrodo esterno (più sottile) è collocato all'interno del recipiente in modo tale che rimanga sul fondo. La distanza tra il lato inferiore della molletta di fissaggio e il fondo della provetta deve essere mantenuta costante (figura 1) poiché influisce sui valori della resistenza elettrica.

Va osservato che qualora il valore di resistenza superi i 20 kΩ, ciò potrebbe dipendere dal fatto che la sostanza ha formato un manto di rivestimento sulla superficie epidermica del disco cutaneo. Il rivestimento può essere rimosso ad esempio sigillando la provetta col pollice rivestito da un guanto e scuotendola per circa 10 secondi. Si procede dunque all'eliminazione della soluzione di magnesio solfato e si ripete la misurazione della resistenza con una nuova soluzione.

La media dei risultati dei valori riferiti alla TER viene accettata a condizione che i valori concomitanti positivi e negativi rientrino nel margine (range) accettabile per il metodo. Le sostanze di controllo da saggiare e i relativi valori minimi e massimi di resistenza accettabili per il metodo e le apparecchiature descritte sono i seguenti:

Controllo	Sostanza	Range delle resistenze (kΩ)
Positivo	10 M acido cloridrico (36%)	0,5-1,0
Negativo	Acqua distillata	10-25

#### 1.5.3.3. Procedura specifica per tensioattivi e sostanze organiche neutre

Se i valori della TER di sostanze di saggio che rientrano nelle categorie dei tensioattivi o delle sostanze organiche neutre sono inferiori o pari a 5 kΩ, si può procedere ad una valutazione della penetrazione del colorante nel tessuto. Tale procedura consente di stabilire se si tratta di risultati falso positivi (2).

##### 1.5.3.3.1. Applicazione e rimozione del colorante solforodamina B

Dopo il trattamento iniziale con la sostanza di saggio viene applicata alla superficie dell'epidermide di ciascun disco cutaneo una soluzione di 150 µl al 10% (p/v) di solforodamina B diluita in acqua distillata per un periodo di 2 ore. I dischi cutanei vengono quindi lavati sotto un getto di acqua corrente a temperatura ambiente per circa 10 secondi al fine di eliminare completamente il colorante. Ogni disco cutaneo viene quindi rimosso cautamente dalla provetta e collocato in una fiala (ad esempio una fiala di scintillazione in vetro da 20 ml) contenente acqua deionizzata (8 ml). Le fiale vengono poi agitate leggermente per 5 minuti per eliminare completamente il colorante. Questa procedura di risciacquo viene ripetuta per procedere quindi alla rimozione dei dischi cutanei che vengono successivamente collocati in fiale contenenti 5 ml di una sostanza al 30% (p/v) di sodio dodecil solfato (SDS) diluita in acqua distillata. Le fiale vengono quindi incubate per tutta la notte ad una temperatura di 60 °C. Dopo il periodo di incubazione ogni singolo disco cutaneo viene rimosso ed eliminato e la soluzione rimanente viene quindi centrifugata per 8 minuti ad una temperatura di 21 °C (forza centrifuga relativa ~ 175). Si preleva quindi un campione di 1 ml del supernatante che viene diluito in parte 1 a 5 (p/v) [ovvero 1 ml + 4 ml] in una soluzione di SDS al 30% (p/v) in acqua distillata. La densità ottica (DO) della soluzione viene misurata a circa 565 nm.

##### 1.5.3.3.2. Calcolo del tenore del colorante

Per ogni disco cutaneo si calcola il tenore del colorante solforodamina B in base ai valori della DO (coefficiente di estinzione molare della solforodamina B a 565 nm =  $8,7 \times 10^4$ ; peso molecolare = 580). Per ciascun disco cutaneo si stabilisce il tenore del colorante e si calcola la media del tenore per i replicati. I valori medi della colorazione sono accettati a condizione che i valori di controllo concomitanti rientrino nel range accettabile per il metodo. Il range del tenore del colorante ritenuto accettabile per le sostanze di controllo in base alla metodologia e alle apparecchiature descritte sono:

Controllo	Sostanza	Range del colorante (µg/disco)
Positivo	10 M Acido cloridrico (36%)	40-100
Negativo	Acqua distillata	15-35

#### 1.5.3.4. Ulteriori dati

Le sostanze da saggiare possono essere applicate ai dischi cutanei anche per periodi più brevi (ad esempio 2 ore) per identificare i materiali che sono estremamente corrosivi. Tuttavia nello studio di convalida è emerso che il saggio TER stimava in eccesso il potenziale corrosivo di una serie di sostanze chimiche da saggiare applicate ai dischi cutanei per 2 ore (2), sebbene consentisse di identificare correttamente le sostanze corrosive e quelle non corrosive dopo un'applicazione di 24 ore.

Le proprietà e le dimensioni delle apparecchiature e della procedura sperimentale utilizzata possono influire sui valori TER. La soglia di corrosività di 5 kΩ è stata stabilita sulla base di dati ottenuti con le apparecchiature specifiche e le procedure descritte nel presente metodo. Se le condizioni di saggio vengono modificate in maniera significativa è probabile che si debbano applicare soglie e valori di controllo diversi. Di conseguenza si raccomanda di calibrare la metodologia e i valori soglia di resistenza saggiando una serie di sostanze standard di riferimento scelte tra quelle utilizzate nel primo studio di convalida (3).

#### 1.6. Principio del metodo di saggio — Saggio del modello di cute umana

Il materiale da saggiare viene applicato localmente ad un modello tridimensionale di cute umana per un massimo di 4 ore; tale modello comprende uno strato epidermico ricostruito in cui è presente anche uno strato corneo funzionale. I materiali corrosivi vengono identificati in base alla loro capacità di ridurre la vitalità delle cellule (ad esempio come nel caso del saggio di riduzione MTT) al di sotto di determinati livelli soglia per periodi di esposizione specifici. Il principio del saggio è basato sull'ipotesi che le sostanze chimiche corrosive sono in grado di penetrare lo strato corneo (per diffusione o erosione) e che la loro citotossicità è tale da provocare la necrosi degli strati cellulari sottostanti.

#### 1.7. Descrizione del metodo di saggio — Saggio del modello di cute umana

##### 1.7.1. Modelli di cute umana

I modelli di cute umana possono provenire da varie fonti, ma devono comunque soddisfare determinati criteri. Il modello di cute deve avere uno strato corneo funzionale e uno strato sottostante di cellule viventi. Lo strato corneo deve essere in grado di svolgere la sua funzione di barriera in modo adeguato. La sua funzionalità può essere appurata dimostrando la capacità di resistenza del modello di cute alla citotossicità mediante applicazione di sostanze notoriamente citotossiche per le cellule ma normalmente non in grado di attraversare la barriera dello strato corneo. Il modello deve poter fornire risultati riproducibili in condizioni sperimentali ben definite.

La vitalità delle cellule viventi nel modello cutaneo deve essere tale da consentire un'adeguata discriminazione tra le sostanze di controllo positive e negative. La vitalità cellulare (ad esempio misurata mediante la quantità di riduzione MTT, ovvero un valore della DO) dopo esposizione ad una sostanza di controllo negativa deve rientrare in limiti accettabili per il modello specificatamente utilizzato. Analogamente i valori della vitalità cellulare in riferimento alla sostanza di controllo positiva (correlati a quelli della sostanza di controllo negativa) devono rientrare in limiti specifici. È essenziale che il modello predittivo utilizzato rispetti gli standard di convalida internazionali (2).

##### 1.7.2. Procedura

##### 1.7.2.1. Applicazione del materiale di saggio

Nei saggi di materiali liquidi occorre applicare la sostanza da saggiare in quantità tale da coprire la superficie cutanea (almeno 25 µl/cm<sup>2</sup>). Nei saggi di materiali solidi si applica la sostanza da saggiare in quantità sufficiente da coprire la cute, quindi la si inumidisce per garantire un contatto ottimale con la cute. Eventualmente le sostanze solide devono essere polverizzate prima dell'applicazione. Il metodo di applicazione deve risultare adeguato per un'ampia gamma di tipi di sostanze chimiche (2). Al termine del periodo di esposizione il materiale da saggiare deve essere accuratamente rimosso dalla superficie cutanea mediante una soluzione salina.

##### 1.7.2.2. Misurazione della vitalità cellulare

Per misurare la vitalità cellulare è possibile utilizzare qualsiasi metodo quantitativo convalidato. Il saggio generalmente più utilizzato è la riduzione MTT che in numerosi laboratori ha fornito risultati accurati e riproducibili (2). Il disco di cute viene collocato in una soluzione MTT di 0,3 mg/ml ad una temperatura di 20-28 °C per 3 ore. Viene quindi estratto il prodotto precipitato blu formazan (estrazione per solvente) e misurata la concentrazione del formazan determinando la DO ad una lunghezza d'onda compresa fra 545 e 595 nm.

1.7.2.3. Ulteriori dati

Il modello cutaneo utilizzato e il protocollo preciso dei tempi di esposizione e delle procedure di lavaggio, ecc. incidono notevolmente sui dati della vitalità cellulare. Si raccomanda pertanto di calibrare la metodologia e il modello predittivo mediante analisi di una serie di standard scelti tra una gamma di sostanze chimiche utilizzate nello studio di convalida del CECMA (3). Il metodo utilizzato deve risultare riproducibile sia all'interno di un laboratorio che tra laboratori per numerose sostanze chimiche in base a standard internazionali. Come minimo il metodo dovrebbe soddisfare il criterio della validità scientifica definito in precedenza (2) e i risultati dello studio di convalida devono essere stati pubblicati in una rivista scientifica dotata di comitato di revisione.

2. **DATI**

2.1. **Elaborazione dei risultati**

2.1.1. *Saggio TER della pelle di ratto*

I valori della resistenza ( $k\Omega$ ) del materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e tutte le sostanze chimiche standard di riferimento dovrebbero essere riportati in una tabella contenente i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione, i valori medi e le classificazioni ottenute.

2.1.2. *Saggio del modello di cute umana*

I valori della DO e i dati sulla vitalità cellulare calcolati in percentuale e relativi al materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e tutte le sostanze chimiche standard di riferimento dovrebbero essere riportati in una tabella contenente i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione, i valori medi e le classificazioni ottenute.

2.2. **Valutazione e interpretazione dei risultati**

2.2.1. *Saggio TER della pelle di ratto*

Se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza di saggio supera i 5  $k\Omega$ , la sostanza non è corrosiva. Se tale valore è inferiore o pari a 5  $k\Omega$  e la sostanza da saggiare non è un surfactante o un organico neutro allora è corrosiva.

Per i surfactanti o le sostanze organiche neutre i cui valori TER sono inferiori o pari a 5  $k\Omega$  è possibile procedere ad una valutazione della penetrazione del colorante. Se il tenore medio del colorante sul disco cutaneo è superiore o pari al valore medio del tenore del colorante riferito alla sostanza di controllo positiva al 36% di HCl ottenuto in concomitanza, allora la sostanza di saggio è un vero positivo ed è dunque corrosiva. Se il tenore medio è inferiore al tenore medio della sostanza di controllo positiva al 36% di HCl ottenuta in concomitanza, allora la sostanza di saggio è un falso positivo e non è corrosiva.

2.2.2. *Saggio del modello di cute umana*

Il valore della DO del controllo negativo rappresenta il 100% della vitalità cellulare, di conseguenza i valori DO ottenuti per ciascun campione da saggiare possono essere utilizzati per calcolare una percentuale di vitalità del controllo negativo. La percentuale critica della vitalità cellulare che differenzia i materiali di saggio corrosivi da quelli non corrosivi (o che distingue tra diverse classi di corrosività) deve essere chiaramente definita nel modello predittivo prima della convalida del metodo e il successivo studio di convalida deve dimostrare che tale valore critico è adeguato (cfr. riferimento bibliografico 2).

3. **RELAZIONE**

**Relazione sul saggio**

La relazione concernente l'intero saggio deve contenere almeno le seguenti informazioni:

*Sostanza di saggio:*

- dati inerenti l'identificazione, la natura fisica ed eventualmente le proprietà fisico-chimiche. Questi dati dovrebbero essere forniti anche per le sostanze di riferimento, se utilizzate.

*Condizioni di saggio:*

- descrizione dettagliata della procedura utilizzata;
- descrizione e motivazione di eventuali modifiche.



*Risultati:*

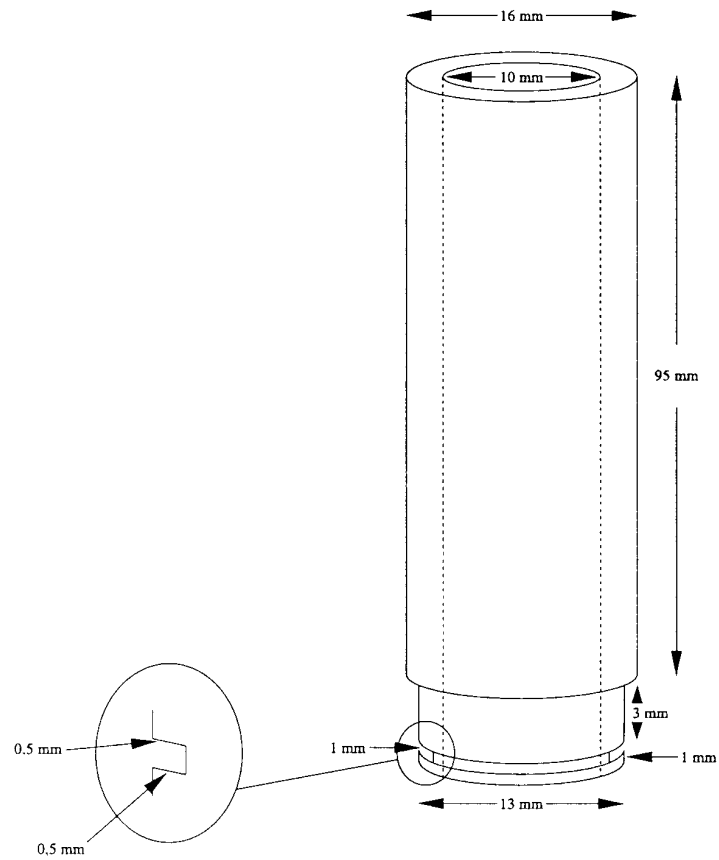
- presentazione in forma tabulare dei valori della resistenza (saggio TER) o dei valori della vitalità cellulare (saggio del modello di cute umana) espressi in percentuale per il materiale di saggio, i controlli positivi e negativi e qualsiasi altra sostanza chimica standard di riferimento, inclusi i dati relativi agli esperimenti di replicazione/ripetizione e le medie;
- descrizione di qualunque altro effetto osservato.

*Discussione dei risultati**Conclusioni***4. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, pagg. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, pagg. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, pagg. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, pagg. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, pagg. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA 26, pagg. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, ATLA 23, pagg. 219-255.

Figura 1

Dimensioni della provetta in PTFE



Dimensioni degli elettrodi

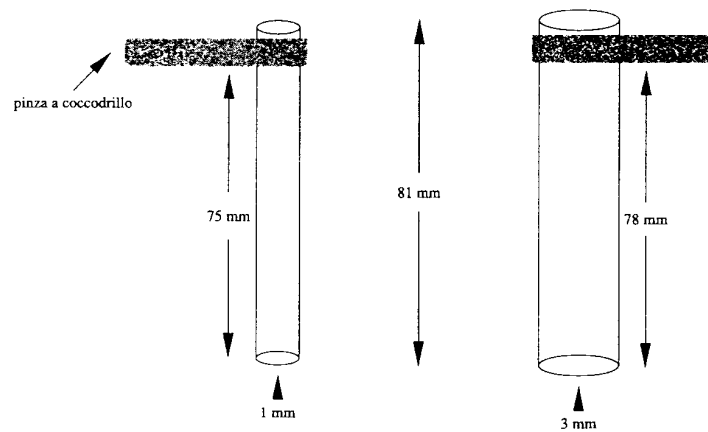
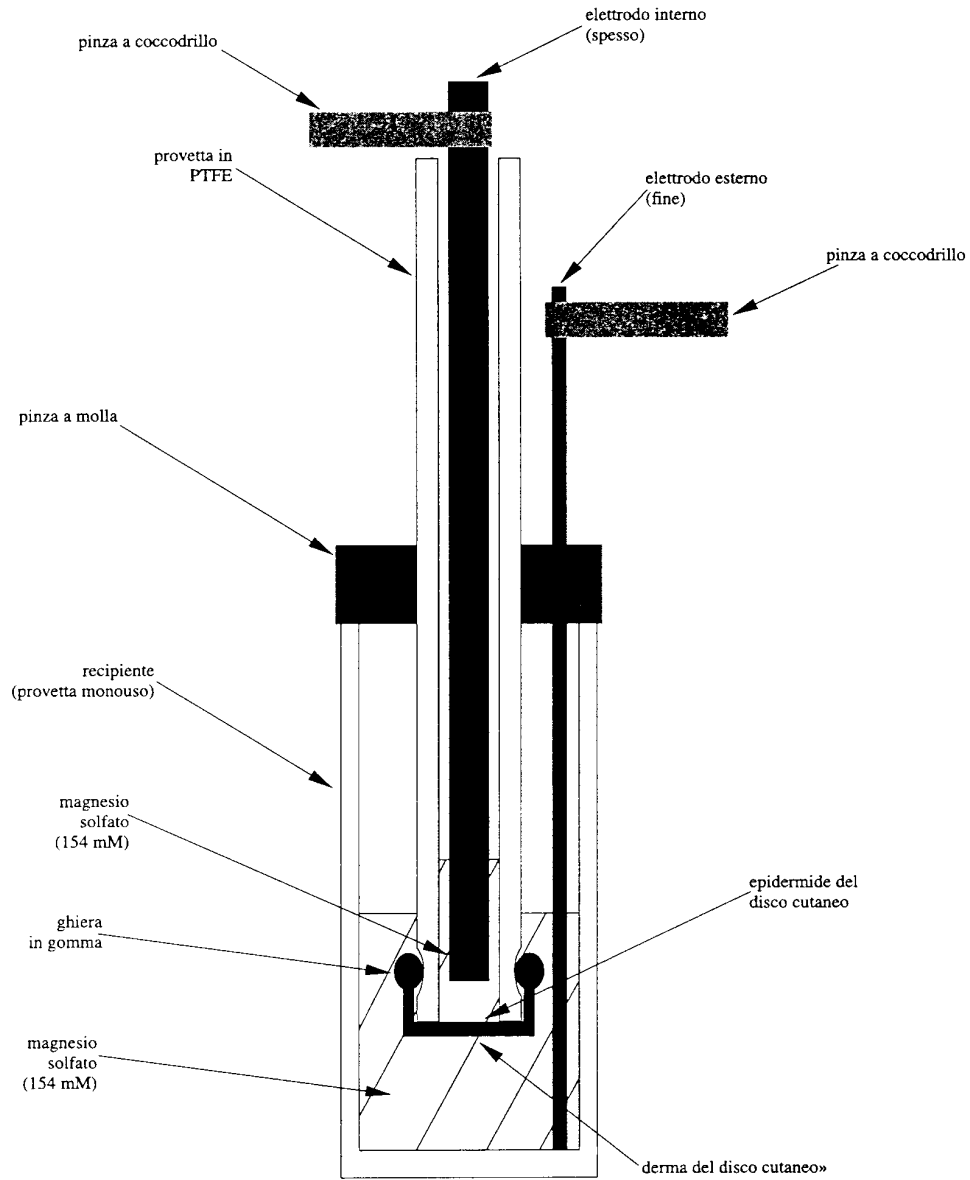


Figura 2

Apparecchiatura per il saggio della TER della pelle di ratto



ALLEGATO II

«B.41. FOTOTOSSICITÀ — SAGGIO DI FOTOTOSSICITÀ IN VITRO 3T3 NRU

1. **METODO**

1.1. **Introduzione**

Per fototossicità si intende la risposta tossica che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

I dati ottenuti mediante il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU consentono di identificare il potenziale fototossico di una sostanza di prova, e cioè la presenza o l'assenza di eventuali rischi connessi alla sostanza di prova in associazione ad esposizione ai raggi UV e alla luce visibile.

Poiché l'«endpoint» tossicologico del saggio in vitro è la determinazione della fotocitotossicità indotta dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, il saggio permette di identificare i composti che sono fototossici in vivo dopo applicazione sistemica e distribuzione sulla cute e i composti con effetto fotoirritante dopo applicazione locale alla cute.

Il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è stato sviluppato e validato nell'ambito di un progetto congiunto UE/COLIPA durante il periodo 1992-1997 (1) (2) (3), allo scopo di definire una valida alternativa in vitro ai vari saggi in vivo normalmente utilizzati. Nel 1996 un workshop dell'OCSE ha raccomandato l'uso di saggio sequenziali in vitro per la valutazione della fototossicità (4).

I risultati del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU sono stati confrontati con gli effetti di fototossicità acuta/fotoirritazione in vivo in animali e soggetti umani, dimostrando così l'eccellente predittività del saggio per tali effetti. Il saggio non è progettato per prevedere altri effetti indesiderati che potrebbero derivare dall'azione combinata di una sostanza chimica e della luce, come ad esempio la fotogenotossicità, la fotoallergia e la fotocarcinogenicità, sebbene molte sostanze chimiche che presentano queste specifiche proprietà reagiscano positivamente al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU. Inoltre, il saggio non è progettato per consentire una valutazione del potere fototossico.

Nell'appendice è descritto un sistema sequenziale per l'esecuzione di prove di fototossicità su sostanze chimiche.

1.2. **Definizioni**

*Irradimento:* l'intensità della luce ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, misurata in  $W/m^2$  o  $mW/cm^2$ .

*Dose di luce:* la quantità (= intensità × tempo) di radiazione ultravioletta (UV) o visibile incidente su una superficie, espressa in joule (=  $W \times s$ ) per area di superficie, ovvero  $J/m^2$  o  $J/cm^2$ .

*Bande di frequenza d'onda della luce UV:* i valori raccomandati dalla CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) sono: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). Sono in uso, inoltre, altri valori: spesso la distinzione fra UVB e UVA viene posta a 320 nm e gli UVA possono essere suddivisi in UV-A1 e UV-A2, con una distinzione posta a circa 340 nm.

*Vitalità cellulare:* parametro che misura l'attività totale di una popolazione di cellule (ad esempio la captazione del colorante vitale rosso neutro nei lisosomi cellulari) che, in funzione dell'«endpoint» misurato e del tipo di saggio impiegato, è correlato al numero totale e/o alla vitalità delle cellule.

*Vitalità cellulare relativa:* vitalità cellulare espressa in relazione a controlli negativi (solventi) che sono stati sottoposti al saggio completo (+UV o -UV) senza trattamento con una sostanza chimica di prova.

*Modello di predittività:* algoritmo impiegato per trasformare i risultati di un saggio di tossicità in dati predittivi del potenziale tossico. In base alle linee guida per l'esecuzione del saggio è possibile utilizzare il PIF e l'MPE per la trasformazione dei risultati del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU in dati predittivi del potenziale fototossico.

*PIF (Photo Irritation Factor):* fattore ottenuto paragonando due concentrazioni di pari citotossicità ( $EC_{50}$ ) della sostanza chimica di prova in assenza (-UV) e in presenza (+UV) di una irradiazione non citotossica con luce UVA/visibile.

*MPE (Mean Photo Effect):* recente misura derivata dall'analisi matematica della forma completa di due curve di concentrazione-risposta ottenuta in assenza (-UV) e in presenza (+UV) di una irradiazione non citotossica con luce UVA/visibile.

*Fototossicità*: risposta tossica acuta che si manifesta dopo esposizione primaria della cute ad alcune sostanze chimiche e successiva esposizione alla luce, o che è indotta analogamente da irradiazione della cute dopo somministrazione sistemica di una sostanza chimica.

*Fotoirritazione*: sottospecie del termine "fototossicità" impiegato per descrivere solo le reazioni fototossiche prodotte sulla cute dopo esposizione a sostanze chimiche (somministrate per via topica o orale). Tali reazioni fototossiche causano sempre danni cellulari non specifici (reazioni analoghe all'eritema solare).

*Fotoallergia*: reattività immunologica acquisita che non si verifica al primo trattamento con una sostanza chimica e successiva esposizione alla luce, ma che necessita di un periodo di induzione di una o due settimane prima che sia possibile dimostrare la reattività cutanea.

*Fotogenotossicità*: risposta genotossica osservata con un "endpoint" genetico, che si manifesta dopo esposizione delle cellule a una dose di luce UV/visibile e a una sostanza chimica non genotossica.

*Fotocarcinogenicità*: carcinogenicità indotta dalla ripetuta applicazione di luce e di una sostanza chimica. Si utilizza il termine "foto-co-carcinogenesi" quando la cancerogenesi indotta dagli UV viene aumentata da una sostanza chimica.

### 1.3. Sostanze di riferimento

Oltre alla sostanza chimica di controllo positivo clorpromazina, che andrebbe saggiata simultaneamente in tutti i saggi, per effettuare il saggio di fototossicità 3T3 NRU si raccomanda di impiegare come sostanze chimiche di riferimento un sottogruppo delle sostanze utilizzate nelle analisi interlaboratorio per il presente saggio (1) (3) (13).

### 1.4. Considerazioni iniziali

È noto che molti tipi di sostanze chimiche inducono effetti fototossici (5) (6) (7) (8). L'unica caratteristica che hanno in comune è la capacità di assorbire l'energia luminosa nello spettro della luce solare. In base alla prima legge della fotochimica (legge di Grotthaus-Draper), la fotoreazione richiede un assorbimento sufficiente di quanti di luce. Pertanto, prima di effettuare la prova biologica in base alle linee guida qui descritte, è necessario determinare uno spettro di assorbimento della luce UV/visibile per la sostanza chimica di prova (ad esempio, in base alle linee guida dell'OCSE: OECD Test Guideline 101). Se il coefficiente di estinzione/assorbimento molare è inferiore a  $10 \text{ litri} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , la sostanza chimica non ha alcun potenziale fotoreattivo e non occorre sottoporla al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, né ad altre prove biologiche atte a determinare effetti fotochimici indesiderati (appendice).

### 1.5. Principio del metodo utilizzato

Sono stati identificati quattro meccanismi in base ai quali l'assorbimento della luce da parte di un cromoforo (chimico) può provocare una risposta fototossica (7). Tutti e quattro i meccanismi provocano lesioni cellulari. Pertanto, il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è basato sul confronto della citotossicità di una sostanza chimica saggiata con e senza esposizione a una dose non citotossica di luce UVA/visibile. In questo saggio, la citotossicità viene espressa come riduzione, dipendente dalla concentrazione, della captazione del colorante vitale rosso neutro [NR, (9)] 24 ore dopo il trattamento con la sostanza chimica di prova e l'irradiazione.

Dapprima si preparano cellule Balb/c 3T3 che vengono mantenute in coltura per 24 ore per permettere la formazione di monostrati. Quindi, per ogni sostanza chimica di prova, vengono preincubate due piastre a 96 pozzetti con otto diverse concentrazioni della sostanza chimica per 1 ora. Una delle due piastre viene poi esposta a una dose non citotossica di luce UVA/visibile di  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA (esperimento +UV), mentre l'altra piastra viene mantenuta nell'oscurità (esperimento -UV). In entrambe le piastre, il terreno di trattamento viene poi sostituito con il terreno di coltura e, dopo altre 24 ore di incubazione, si determina la vitalità cellulare tramite captazione del rosso neutro (Neutral Red Uptake, NRU) per 3 ore. Per ognuna delle otto concentrazioni di prova viene dunque calcolata la vitalità cellulare relativa, espressa come percentuale dei controlli negativi non trattati. Per prevedere il potenziale fototossico vengono confrontate le risposte di concentrazione ottenute in presenza (+UV) e in assenza (-UV) di irradiazione, generalmente al livello  $EC_{50}$ , cioè alla concentrazione che inibisce la vitalità cellulare del 50% rispetto ai controlli non trattati.

### 1.6. Criteri di qualità

*Sensibilità delle cellule agli UVA; dati storici*: Ad intervalli regolari occorre controllare la sensibilità delle cellule agli UVA. Le cellule vengono seminate alla stessa densità utilizzata nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU; il giorno successivo vengono irradiate con dosi di UVA da  $1$  a  $9 \text{ J/cm}^2$ , e il giorno ancora successivo si determina la vitalità cellulare tramite saggio di NRU. Le cellule soddisfano i requisiti di qualità se la loro vitalità, dopo irradiazione con  $5 \text{ J/cm}^2$  di UVA, non è inferiore all'80% della vitalità dei controlli mantenuti nell'oscurità. Alla dose massima di UVA ( $9 \text{ J/cm}^2$ ), la vitalità non deve essere inferiore al 50% rispetto a quella dei controlli mantenuti nell'oscurità. Questo controllo va ripetuto all'incirca ogni dieci passaggi di cellule.

*Sensibilità agli UVA delle cellule di controllo negativo; saggio in oggetto*: Il saggio soddisfa i criteri di qualità se i controlli negativi [cellule in soluzione salina isotonica di Earl (EBSS) con o senza l'1% di dimetilsolfossido (DMSO) o l'1% di etanolo (EtOH) nell'esperimento +UVA] mostrano una vitalità non inferiore all'80% di quella delle cellule non irradiate nello stesso solvente del corrispondente esperimento in oscurità (-UVA).

*Vitalità dei controlli negativi:* La densità ottica assoluta ( $OD_{540\text{ NRU}}$ ) misurata nell'estratto di rosso neutro dei controlli negativi indica se le cellule ( $1 \times 10^4$ ) seminate in ogni pozzetto siano cresciute con un tempo di raddoppiamento normale durante i due giorni della prova. Il saggio soddisfa i criteri di accettazione se la  $OD_{540\text{ NRU}}$  media dei controlli non trattati è  $\geq 0,2$ .

*Controllo positivo:* Contemporaneamente al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, si saggia una sostanza chimica notoriamente fototossica. Si raccomanda l'uso di clorpromazina (CPZ), poiché tale sostanza è stata impiegata come controllo positivo nello studio di validazione UE/COLIPA. Per la CPZ saggiata con il protocollo standard nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU, sono stati definiti i seguenti criteri di accettazione: CPZ irradiata (+UVA):  $EC_{50} =$  da 0,1 a 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ; CPZ non irradiata (-UVA):  $EC_{50} =$  da 7,0 a 90,0  $\mu\text{g/ml}$ . Il PIF, cioè lo spostamento di  $EC_{50}$ , deve essere almeno pari a 6.

Come controlli positivi concomitanti, al posto della CPZ possono essere impiegate altre sostanze chimiche notoriamente fototossiche, corrispondenti alla classe chimica o alle caratteristiche di solubilità della sostanza chimica di prova. In questo caso, sulla base dei dati storici, occorre definire adeguatamente l'intervallo di  $EC_{50}$  e del PIF o MPE come criterio di accettazione del saggio.

#### 1.7. Descrizione del metodo utilizzato

##### 1.7.1. Preparazioni

##### 1.7.1.1. Cellule

Nello studio di validazione è stata usata una linea cellulare permanente di fibroblasti di topo — Balb/c 3T3, clone 31 — proveniente dall'ATCC o dall'ECACC. Se ne raccomanda pertanto l'uso in ogni saggio. Applicando lo stesso protocollo, si possono utilizzare con eguale efficacia anche altre cellule o linee cellulari se le condizioni della coltura vengono adattate alle esigenze specifiche delle cellule; tuttavia, è necessario dimostrare l'equivalenza.

È necessario verificare con regolarità che le cellule non siano contaminate da micoplasmi; le cellule vanno utilizzate solo se i risultati dei controlli sono soddisfacenti.

Poiché la sensibilità delle cellule agli UVA può aumentare con il numero di passaggi, vanno impiegate cellule Balb/c 3T3 del numero più basso ottenibile di passaggi, preferibilmente inferiore a 100. È importante che la sensibilità delle cellule Balb/c 3T3 agli UVA venga controllata regolarmente seguendo la procedura di controllo della qualità descritta in queste linee guida.

##### 1.7.1.2. Condizioni dei mezzi e della coltura

Per il passaggio di routine delle cellule e durante il saggio è necessario utilizzare mezzi di coltura e condizioni di incubazione adeguati. Nel caso delle cellule Balb/c 3T3, occorre integrarle con DMEM al 10% di siero di vitello neonato, 4 mM di glutamina, penicillina e streptomina, nonché incubazione umidificata a  $37^\circ\text{C}$  /7,5% di  $\text{CO}_2$ . È particolarmente importante che le condizioni della coltura cellulare assicurino un tempo di ciclo cellulare compreso nel normale range storico delle cellule o della linea cellulare utilizzate.

##### 1.7.1.3. Preparazione delle colture

Le cellule ottenute da colture base congelate vengono seminate nel terreno di coltura alla densità adeguata e poste in sottocoltura almeno una volta prima di essere utilizzate per il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

Per il saggio di fototossicità occorre seminare le cellule nel terreno di coltura ad una densità tale che impedisca alle colture di raggiungere la confluenza prima della fine, cioè quando viene determinata la vitalità cellulare 48 ore dopo la semina. Per le cellule Balb/c 3T3 coltivate in piastre a 96 pozzetti la densità raccomandata è di  $1 \times 10^4$  cellule per pozzetto.

Per ogni sostanza chimica di prova si seminano cellule in maniera identica in due diverse piastre a 96 pozzetti, che vengono poi sottoposte simultaneamente all'intera procedura in condizioni culturali identiche, salvo il periodo di tempo in cui una delle piastre viene irradiata (+UVA/visibile) mentre l'altra viene tenuta nell'oscurità (-UVA/visibile).

##### 1.7.1.4. Attivazione metabolica

Mentre l'uso di sistemi metabolizzanti è un requisito generale di tutte le prove in vitro per la previsione della genotossicità e del potenziale carcinogenico, finora, nel caso della fototossicologia, non si conosce alcuna sostanza chimica che necessita della trasformazione metabolica per agire da fototossina in vivo o in vitro. Pertanto non si ritiene necessario, né scientificamente giustificato, svolgere questo saggio con un sistema di attivazione metabolica.

## 1.7.1.5. Sostanza chimica di prova/Preparazione

Le sostanze chimiche di prova devono essere preparate di fresco immediatamente prima dell'uso, a meno che la conservazione risulti accettabile in base ai dati relativi alla stabilità. Quando è probabile che si verifichi una rapida fotodegradazione, può essere necessaria la preparazione sotto luce rossa.

Le sostanze chimiche di prova vanno dissolte in soluzioni saline tampone, come la soluzione isotonica di Earle (EBSS) o la soluzione salina tampone fosfato (PBS) che, per evitare interferenze durante l'irradiazione, devono essere prive di componenti proteiche e coloranti indicatori di pH che assorbono la luce.

Le sostanze chimiche di prova scarsamente solubili in acqua devono essere dissolte in solventi adeguati, ad una concentrazione pari a 100 volte la concentrazione finale desiderata e poi diluite in 1:100 con la soluzione tampone. Eventuali solventi devono essere presenti a un volume costante dell'1% (v/v) in tutte le colture, e cioè sia nei controlli negativi che in tutte le concentrazioni della sostanza chimica di prova.

I solventi raccomandati sono il dimetilsolfossido (DMSO) e l'etanolo (EtOH). Possono essere adatti anche altri solventi a bassa citotossicità (come l'acetone), ma è necessario valutarne attentamente le proprietà specifiche, quali la reazione con la sostanza chimica di prova, l'estinzione dell'effetto fototossico, le proprietà di cattura dei radicali.

Se necessario, si può procedere a miscelazione tramite vortex e/o sonicazione e/o riscaldamento fino a 37°C per favorire la solubilizzazione.

## 1.7.1.6. Irradiazione UV/Preparazione

*Fonte di luce:* la scelta di una fonte di luce e di un filtro adeguati è il fattore più importante ai fini di un corretto saggio della fototossicità. Gli spettri di UVA e della luce visibile si associano generalmente a fotosensibilizzazione (7) (10), mentre gli UVB sono meno rilevanti perché fortemente citotossici in via diretta, visto che la loro citotossicità aumenta di 1000 volte da 313 a 280 nm (11). Per scegliere una fonte luminosa adeguata valgono, tra l'altro, i seguenti criteri essenziali: la fonte di luce deve emettere lunghezze d'onda assorbite dalla sostanza chimica di prova e la dose di luce (ottenibile in tempi ragionevoli) deve essere sufficiente per individuare i fotosensibilizzanti noti. Inoltre, le lunghezze d'onda e le dosi utilizzate non devono essere eccessivamente nocive per il sistema, che comporta anche emissione di calore (regione dell'infrarosso).

La fonte di luce ottimale è la simulazione della luce del sole con simulatori solari. Nei simulatori solari si usano sia gli archi allo xeno che gli archi di mercurio e ad alogenuri metallici (drogati). Questi ultimi presentano il vantaggio di emettere meno calore e di essere meno costosi, ma la loro corrispondenza con la luce solare non è perfetta. Poiché tutti i simulatori solari emettono quantità significative di UVB, vanno muniti di filtri adeguati per attenuare le lunghezze d'onda UVB altamente citotossiche.

Per il saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU è necessario usare uno spettro di irradiazione praticamente privo di UVB (UVA:UVB ~ 1:20). È stato pubblicato un esempio della distribuzione dell'irradiazione spettrale del simulatore solare con filtro impiegato nello studio di validazione del saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (3).

*Dosimetria:* Prima di effettuare il saggio di fototossicità occorre controllare regolarmente l'intensità della luce (irradiazione) mediante opportuno misuratore UV a banda larga. Il misuratore UV deve essere stato calibrato sulla fonte. È necessario controllare la funzionalità del misuratore UV e, a tale scopo, si raccomanda di impiegare un secondo misuratore UV di riferimento, dello stesso tipo e con identica calibrazione. L'ideale sarebbe che, a intervalli di tempo più lunghi, con uno spettroradiometro si misurasse l'irradiazione spettrale della fonte di luce filtrata e si controllasse la calibrazione del misuratore UV a banda larga; tali strumenti richiedono tuttavia l'intervento di personale specializzato.

Lo studio di validazione ha stabilito che una dose di 5 J/cm<sup>2</sup> (UVA) non è citotossica per le cellule Balb/c 3T3 ed è sufficientemente potente per eccitare anche le sostanze chimiche a bassa fototossicità. Allo scopo di ottenere una dose di 5 J/cm<sup>2</sup> entro 50 minuti, l'irradiazione deve essere regolata a 1,666 mW/cm<sup>2</sup>. Se si utilizzano un'altra linea cellulare o una diversa fonte di luce, potrebbe essere necessario adattare leggermente la dose di UVA, a condizione che non sia nociva per le cellule e che sia sufficiente per individuare le fototossine standard. Il tempo di esposizione alla luce si calcola come segue:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose di irradiazione (J/cm}^2) \times 1000}{\text{irradiazione (mW/cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

## 1.7.2. Condizioni di esecuzione del saggio

La concentrazione massima della sostanza chimica di prova non deve superare i 100 µg/ml, poiché la fototossicità di tutte le sostanze chimiche è stata rilevata a concentrazioni inferiori, mentre a concentrazioni maggiori aumenta l'incidenza dei falsi positivi (previsioni sovrastimate) (13). Il pH della concentrazione più alta della sostanza chimica di prova deve essere soddisfacente (range del pH: 6,5-7,8).

Gli intervalli delle concentrazioni di una sostanza chimica sottoposta a prova in presenza (+UVA) e in assenza (-UVA) di luce vanno determinati in modo adeguato in precedenti esperimenti espressamente effettuati a tale scopo. Occorre adeguare l'intervallo e l'intercetta di una serie di concentrazioni in modo che le curve concentrazione-risposta siano sufficientemente corroborate da dati sperimentali. È necessario utilizzare le serie di concentrazioni geometriche (con un fattore di diluizione costante).

### 1.7.3. Procedura del saggio<sup>(1)</sup>

#### 1.7.3.1. Primo giorno

Preparare una sospensione di cellule di  $1 \times 10^5$  cellule/ml nel terreno di coltura e versare 100  $\mu$ L di terreno di coltura solo nei pozzetti periferici di una piastra per microtitolazione di coltura tissutale a 96 pozzetti (= bianchi). Nei restanti pozzetti versare 100  $\mu$ L di una sospensione cellulare di  $1 \times 10^5$  cellule/ml (=  $1 \times 10^4$  cellule/pozzetto). Per ciascuna sostanza chimica di prova preparare due piastre: una per determinare la citotossicità (-UVA) e l'altra per determinare la fotocitotossicità (+UVA).

Incubare le cellule per 24 ore (7,5% di CO<sub>2</sub>, 37°C) finché formano un monostrato semiconfluente. Questo periodo di incubazione tiene conto del recupero e dell'aderenza delle cellule, nonché della crescita esponenziale.

#### 1.7.3.2. Secondo giorno

Dopo l'incubazione, far decantare il terreno di coltura dalle cellule e lavare due volte con 150  $\mu$ L di EBSS/PBS per pozzetto. Aggiungere 100  $\mu$ L di EBSS/PBS contenente la concentrazione corretta della sostanza chimica di prova o solo solvente (controllo negativo). Utilizzare 8 diverse concentrazioni della sostanza chimica di prova. Incubare le cellule con la sostanza chimica di prova nell'oscurità per 60 minuti (7,5% di CO<sub>2</sub>, 37°C).

Per eseguire la parte +UVA del saggio, irradiare le cellule a temperatura ambiente per 50 minuti attraverso il coperchio della piastra con 1,7 mW/cm<sup>2</sup> di UVA (= 5 J/cm<sup>2</sup>). Ventilare con una ventola per evitare la condensazione di H<sub>2</sub>O sotto il coperchio. Mantenere le altre piastre (-UVA) a temperatura ambiente in una scatola scura per 50 minuti (= tempo di esposizione agli UVA).

Far decantare la soluzione di prova e lavare due volte con 150  $\mu$ L di EBSS/PBS. Sostituire l'EBSS/PBS con terreno di coltura e incubare (7,5% di CO<sub>2</sub>, 37°C) per una notte (18-22 ore).

#### 1.7.3.3. Terzo giorno

##### Esame al microscopio

Esaminare le cellule con un microscopio a contrasto di fase. Registrare i cambiamenti morfologici delle cellule dovuti agli effetti citotossici della sostanza chimica di prova. Si raccomanda questo controllo per escludere errori sperimentali, sebbene questi dati non vengano utilizzati per la valutazione della citotossicità o della fototossicità.

##### Prova della captazione del rosso neutro

Lavare le cellule con 150  $\mu$ L di EBSS/PBS preriscaldata. Rimuovere la soluzione di lavaggio con lievi colpetti. Aggiungere 100  $\mu$ L di terreno al rosso neutro e incubare a 37°C in atmosfera umidificata al 7,5% di CO<sub>2</sub> per 3 ore.

Dopo l'incubazione, rimuovere il terreno al rosso neutro e lavare le cellule con 150  $\mu$ L di EBSS/PBS. Far decantare e asciugare totalmente l'EBSS/PBS. (Centrifugare a piastra rovesciata è opzionale).

Aggiungere esattamente 150  $\mu$ L di soluzione di estinzione di rosso neutro (etanolo/acido acetico preparati di fresco).

Scuotere rapidamente la piastra di microtitolazione con un agitatore per 10 minuti fino ad estrazione del rosso neutro dalle cellule e formazione di una soluzione omogenea.

Misurare la densità ottica dell'estratto di rosso neutro a 540 nm con uno spettrofotometro, utilizzando i bianchi come riferimento. Salvare i dati nel formato di file adeguato (ad esempio ASCII) per le analisi successive.

<sup>(1)</sup> Per ulteriori dettagli, cfr. il riferimento bibliografico (12).



2. **DATI**

2.1. **Qualità e quantità dei dati**

I dati devono permettere un'analisi significativa della concentrazione-risposta ottenuta in presenza e in assenza di irradiazione UVA/visibile. Se si rileva citotossicità, è necessario fissare sia il range della concentrazione che l'intervallo delle singole concentrazioni in modo da adattare una curva ai dati sperimentali. Poiché una sostanza chimica di prova potrebbe non essere citotossica fino alla concentrazione limite definita di 100 µg/ml nell'esperimento in oscurità (-UVA), ma altamente citotossica in caso di irradiazione (+UVA), potrebbe essere necessario che i range della concentrazione da saggiare differiscano per ordine di grandezza per garantire un'adeguata qualità dei dati. Se non si rileva citotossicità in nessuna delle due parti dell'esperimento (-UVA e +UVA), è sufficiente effettuare il saggio con un maggiore intervallo fra dosi singole fino alla concentrazione più elevata.

Non occorre verificare i risultati chiaramente positivi ripetendo l'esperimento. Non occorre neppure verificare i risultati chiaramente negativi, purché la sostanza chimica di prova sia stata saggiata a concentrazioni sufficientemente alte. In tali casi è sufficiente un esperimento principale, sostenuto da uno o più esperimenti preliminari di definizione dei range.

I saggi che hanno dato risultati borderline vicini alla linea di demarcazione del modello di predittività vanno ripetuti per verifica.

Se si ritiene necessario ripetere il saggio, potrebbe essere importante variare le condizioni sperimentali allo scopo di ottenere un risultato chiaro. Una variabile fondamentale di questo saggio è la preparazione delle soluzioni della sostanza chimica di prova. Pertanto, la variazione di tali condizioni (co-solvente, triturazione, sonicazione) può essere di enorme importanza nel saggio di ripetizione. Alternativamente si può prendere in considerazione l'ipotesi di variare il tempo di incubazione pre-irradiazione. Un tempo più breve può essere determinante per le sostanze chimiche instabili in acqua.

2.2. **Trattamento dei risultati**

Ove possibile, si determina la concentrazione di una sostanza chimica di prova che riflette una inibizione del 50% dell'NRU cellulare (EC<sub>50</sub>). A tale scopo si applica una qualunque procedura di regressione non lineare (preferibilmente una funzione di Hill o la regressione logistica) ai dati concentrazione-risposta, oppure si utilizzano altre procedure di adeguamento (14). Prima di utilizzare una EC<sub>50</sub> per ulteriori calcoli occorre controllare in modo adeguato la qualità dell'adattamento alla rappresentazione grafica. Alternativamente possono essere impiegati metodi di adattamento alla rappresentazione grafica per calcolare l'EC<sub>50</sub>. In questo caso si raccomanda l'uso di carte di probabilità (scala x: log, scala y: probit), poiché in molti casi la funzione concentrazione-risposta diventerà quasi lineare dopo questa trasformazione.

2.3. **Valutazione dei risultati (modelli di predittività)**

2.3.1. *Modello di predittività versione 1: PIF*

Se si ottengono curve concentrazione-risposta complete sia in presenza (+UVA) che in assenza (-UVA) di luce, il fattore di fotoirritazione (PIF) si calcola tramite la formula seguente:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un PIF < 5 non predice alcun potenziale fototossico, mentre un PIF ≥ 5 predice un potenziale fototossico.

Se una sostanza chimica è citotossica solo +UVA e non è citotossica al saggio -UVA, non è possibile calcolare il PIF, sebbene si tratti di un risultato che indica un potenziale fototossico. In tali casi è possibile calcolare un "> PIF" se il saggio di citotossicità (-UV) viene eseguito fino alla concentrazione di prova più elevata (C<sub>max</sub>) e tale valore viene usato per calcolare il "> PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Se è possibile ottenere solo un "> PIF", qualunque valore > 1 predice un potenziale fototossico.

Se non è possibile calcolare né l'EC<sub>50</sub> (-UV) né l'EC<sub>50</sub> (+UV) a causa del fatto che una sostanza chimica non risulta essere citotossica fino alla più alta concentrazione di prova, questo indica l'assenza di potenziale fototossico. In tali casi per caratterizzare il risultato si utilizza un formale "PIF = \*1"

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Se è possibile ottenere solo un "PIF = \*1", ciò non predice alcun potenziale fototossico.

Nei casi (b) e (c), ai fini della predittività del potenziale fototossico è necessario tenere in debita considerazione le concentrazioni ottenute al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU.

2.3.2. *Modello di predittività versione 2: MPE*

Alternativamente è possibile applicare una nuova versione del modello per prevedere il potenziale fototossico, sviluppata in base ai dati dello studio di validazione UE/COLIPA (15) e saggiata in cieco in un successivo studio sulla fototossicità in vitro delle sostanze chimiche a filtro UV (13). Tale modello sopperisce ai limiti del modello PIF nei casi in cui è impossibile ottenere un'EC<sub>50</sub>. Il modello utilizza il "Mean Photo Effect" (MPE), una misura basata sul confronto delle curve complete concentrazione-risposta. Per l'applicazione del modello MPE la Humboldt Universität di Berlino ha sviluppato un software disponibile gratuitamente.

2.4. **Interpretazione dei risultati**

Un risultato positivo al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (PIF ≥ 5 o MPE ≥ 0,1) indica che la sostanza di prova ha un potenziale fototossico. Se si ottiene tale risultato a concentrazioni inferiori a 10 µg/ml, è altresì probabile che la sostanza chimica di prova si comporti da fototossina in varie condizioni di esposizione in vivo. Se si ottiene un risultato positivo solo alla concentrazione di prova più elevata (100 µg/ml), possono essere necessarie ulteriori considerazioni per la valutazione del rischio o del potere fototossico, quali dati sulla penetrazione, l'assorbimento e il possibile accumulo della sostanza chimica nella cute, oppure l'analisi della sostanza in un saggio alternativo di conferma, ad esempio impiegando un modello di cute umana in vitro.

Un risultato negativo al saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU (PIF < 5 o MPE < 0,1) indica che la sostanza di prova non è fototossica per le cellule di mammifero in coltura nelle condizioni di saggio. Nei casi in cui è stato possibile provare la sostanza chimica fino alla concentrazione più elevata (100 µg/ml) un risultato negativo indica che tale sostanza non ha potenziale fototossico e la fototossicità in vivo può essere considerata improbabile. Nei casi in cui si ottengano identiche risposte tossicità-concentrazione (EC<sub>50</sub> +UV e EC<sub>50</sub> -UV) a concentrazioni inferiori, l'interpretazione dei dati sarebbe la stessa. Diversamente, se non viene dimostrata tossicità (+UV e -UV) e se la solubilità in acqua limita le concentrazioni a valori inferiori a 100 µg/ml, allora può essere messa in dubbio la compatibilità della sostanza di prova con il saggio e va presa in considerazione l'idea di eseguire prove di conferma (ad esempio usando un modello di cute in vitro o un modello di cute ex vivo o un saggio in vivo).

3. **RELAZIONE**

**Relazione sul saggio effettuato**

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni:

*Sostanza chimica di prova:*

- dati di identificazione e numero CAS, se noto
- caratteristiche fisiche e purezza
- proprietà fisicochimiche rilevanti per l'esecuzione dello studio
- stabilità e fotostabilità, se note

*Solvente:*

- motivazione della scelta del solvente
- solubilità della sostanza chimica di prova in questo solvente
- percentuale di solvente presente nel terreno di trattamento (EBSS o PBS)

*Cellule:*

- tipo e origine
- assenza di micoplasmici
- numero di passaggi delle cellule, se noto
- sensibilità delle cellule agli UVA, determinata con gli strumenti per irradiazione usati nel saggio di fototossicità in vitro 3T3 NRU

*Condizioni di esecuzione del saggio (a) — incubazione prima e dopo il trattamento:*

- tipo e composizione del terreno di coltura
- condizioni di incubazione (concentrazione di CO<sub>2</sub>, temperatura, umidità)
- durata dell'incubazione (pre-trattamento, post-trattamento)

*Condizioni di esecuzione del saggio (b) — trattamento con la sostanza chimica:*

- criteri di scelta delle concentrazioni della sostanza chimica di prova usata sia in presenza che in assenza di irradiazione UV/visibile
- in caso di solubilità limitata della sostanza chimica di prova e assenza di citotossicità, motivi della scelta di una concentrazione più elevata
- tipo e composizione del terreno di trattamento (soluzione salina tampone)
- durata del trattamento chimico

*Condizioni di esecuzione del saggio (c) — irradiazione:*

- motivo della scelta della fonte di luce utilizzata nel saggio
- caratteristiche di irradiazione spettrale della fonte di luce
- caratteristiche di trasmissione/assorbimento del/i filtro/i usato/i
- caratteristiche del radiometro e particolari sulla sua calibrazione
- distanza della fonte di luce dal sistema di prova
- irradiazione UVA a tale distanza, espresso in  $\text{mW}/\text{cm}^2$
- durata dell'esposizione alla luce UV/visibile
- dose UVA (irradiazione  $\times$  tempo), espressa in  $\text{J}/\text{cm}^2$
- temperatura delle colture cellulari durante l'irradiazione e delle colture cellulari mantenute in oscurità

*Condizioni di esecuzione del saggio (d) — prova NRU*

- composizione del terreno al rosso neutro
- durata dell'incubazione nel rosso neutro
- condizioni di incubazione (concentrazione di  $\text{CO}_2$ , temperatura, umidità)
- condizioni di estrazione del rosso neutro (estraente, durata)
- lunghezza d'onda usata per la lettura spettrofotometrica della densità ottica del rosso neutro
- seconda lunghezza d'onda (riferimento), se utilizzata
- contenuto del bianco spettrofotometrico, se utilizzato

*Risultati*

- vitalità cellulare ottenuta a ciascuna concentrazione della sostanza chimica di prova, espressa in vitalità percentuale media dei controlli
- curve concentrazione-risposta (concentrazione della sostanza chimica di prova vs. vitalità cellulare relativa), ottenuta negli esperimenti simultanei + UVA e - UVA
- analisi dei dati delle curve concentrazione-risposta: se possibile, computo/calcolo dell' $\text{EC}_{50}$  (+ UVA) e dell' $\text{EC}_{50}$  (- UVA)
- confronto delle due curve concentrazione-risposta ottenute in presenza e in assenza dell'irradiazione UVA/visibile, o tramite calcolo del PIF, o tramite calcolo dell'MPE
- classificazione del potenziale fototossico
- criteri di accettazione del saggio (a) — controllo negativo simultaneo:
  - vitalità assoluta (densità ottica dell'estratto di rosso neutro) delle cellule irradiate e non irradiate
  - dati storici del controllo negativo, deviazione media e standard
- criteri di accettazione del saggio (b) — controllo positivo simultaneo:
  - $\text{EC}_{50}$  (+UVA) e  $\text{EC}_{50}$  (- UVA) e PIF della sostanza chimica di controllo positiva
  - dati storici riguardanti la sostanza chimica di controllo positiva:  $\text{EC}_{50}$  (+UVA) e  $\text{EC}_{50}$  (- UVA) e PIF, deviazione media e standard

*Discussione dei risultati*

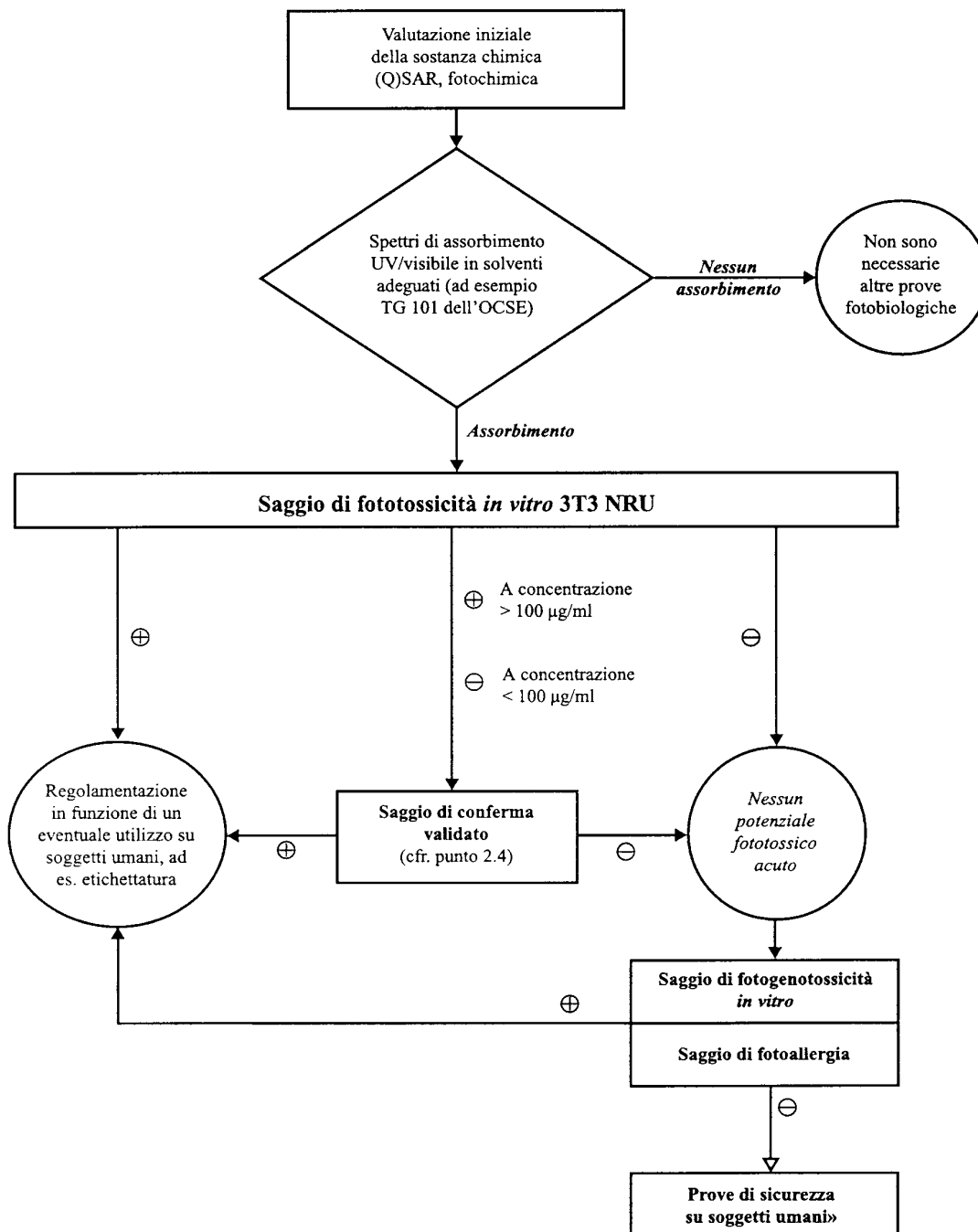
*Conclusioni*

4. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, pagg. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, pagg. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pagg. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pagg. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pagg. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapor, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, pagg. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pagg. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pagg. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pagg. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pagg. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, pagg. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pagg. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, pagg. 445-462.

Appendice

**Ruolo del saggio di fototossicità 3T3 NRU in un sistema sequenziale di saggio di fototossicità delle sostanze chimiche**



## ALLEGATO 2H

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

## 1. METODO

Questo saggio corrisponde al TG 429 (2002) dell'OCSE

## 1.1 INTRODUZIONE

Il Local Lymph Node Assay (LLNA) è stato validato ed accettato a sufficienza da giustificarne l'adozione come nuovo Metodo (1)(2)(3). Si tratta del secondo metodo per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche sugli animali. L'altro metodo (B.6) utilizza i saggi sui porcellini d'India e in particolare il guinea pig maximisation test (test di massimizzazione sui porcellini d'India) e il saggio di Buehler (4).

LLNA costituisce un metodo alternativo da usarsi per identificare le sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea e per confermare che le sostanze chimiche non hanno un potenziale significativo di sensibilizzazione cutanea. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA vada usato in tutti i casi in sostituzione del test sui porcellini d'India, ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma.

LLNA presenta alcuni vantaggi per ciò che concerne sia il progresso scientifico che il benessere degli animali. Esso studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi che consentono la valutazione della risposta alla dose. I particolari della validazione dell'LLNA e una rassegna del lavoro ad essa associato sono stati pubblicati (5)(6)(7)(8). Inoltre, occorre sottolineare che i sensibilizzanti lievi/moderati, raccomandati come sostanze di controllo positive adeguate per i saggi sui porcellini d'India, sono idonei anche per l'uso con l'LLNA (6)(8)(9).

LLNA è un metodo *in vivo* e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo. Inoltre, l'LLNA rappresenta un significativo miglioramento del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto. L'LLNA è basato sull'attenta valutazione delle manifestazioni immunologiche indotte dalle sostanze chimiche durante la fase di induzione della sensibilizzazione. Diversamente dai saggi sui porcellini d'India, l'LLNA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India. Per questo motivo, l'LLNA riduce la sofferenza degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA rispetto ai tradizionali saggi sui porcellini d'India, occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego dei saggi tradizionali (ad es., risposte falsi negativi nell'LLNA con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei) (10).

Vedi anche Introduzione, parte B.

## 1.2 PRINCIPIO DEL METODO

Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione primaria dei linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose applicata (e alla potenza dell'allergene) e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa oggettiva della sensibilizzazione. L'LLNA valuta tale proliferazione come rapporto dose-risposta in cui la proliferazione osservata nei gruppi sperimentali viene confrontata con quella nei controlli trattati con il veicolo. Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione nei gruppi trattati e quella dei controlli trattati con il solo veicolo, definito Indice di Stimolazione, che deve essere almeno di tre prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. I metodi qui descritti si basano sull'uso della marcatura radioattiva per misurare la proliferazione delle cellule. È possibile però impiegare anche altri criteri per la valutazione della proliferazione, sempre che vi siano una giustificazione e un adeguato sostegno scientifico, comprese citazioni complete e la descrizione della metodologia.

1.3 DESCRIZIONE DEL METODO

1.3.1 **Preparazioni**

1.3.1.1 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C ( $\pm 3$  °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

1.3.1.2 *Preparazione degli animali*

Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio), e tenuti nelle loro gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertare che non presentino lesioni cutanee visibili.

1.3.2 **Condizioni del saggio**

1.3.2.1 *Animali sperimentali*

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

1.3.2.2 *Controllo dell'affidabilità*

Per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato e che il laboratorio ha competenza nel condurre il saggio con successo, si utilizzano controlli positivi. Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione (SI)  $> 3$  rispetto al gruppo di controllo negativo. La dose per il controllo positivo va scelta in modo che l'induzione sia definita ma non eccessiva. Le sostanze di elezione sono l'esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0, EINECS 202-983-3) e il mercaptobenzotiazolo (CAS 149-30-4, EINECS 205-736-8). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra. Mentre normalmente ciascun saggio può richiedere un gruppo di controllo positivo, possono esservi delle situazioni in cui i laboratori sperimentali hanno a disposizione dati pregressi su controlli positivi per dimostrare la coerenza di una risposta soddisfacente per un periodo di sei mesi o superiore. In tali situazioni può essere appropriato eseguire saggi meno frequenti con controlli positivi a intervalli non superiori a 6 mesi. Sebbene la sostanza di controllo positiva vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad es. acetone: olio di oliva), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente). In tale situazione, è necessario sottoporre a saggio la possibile interazione di un controllo positivo con tale veicolo non convenzionale.

1.3.2.3 *Numero di animali, livelli di dose e scelta del veicolo.*

Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo trattato solo con il veicolo per la sostanza sperimentale e, ove pertinente, un controllo positivo. Nei casi in cui sia necessario raccogliere dati su animali singoli, si utilizzano almeno cinque animali per gruppo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

La selezione delle dosi e del veicolo vanno basate sulle raccomandazioni contenute nella voce bibliografica (1). Le dosi vanno selezionate fra le concentrazioni 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. Ove disponibili, occorre tenere conto dei dati esistenti circa la tossicità acuta e l'irritazione cutanea, nel selezionare le tre concentrazioni consecutive, in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e l'eccessiva irritazione cutanea locale (2)(11).

Il veicolo va selezionato con l'obiettivo di massimizzare le concentrazioni sperimentali e la solubilità producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. In ordine di preferenza, i veicoli raccomandati sono acetone/olio di oliva (4:1 v/v), dimetilformamide, metiletilcheton, glicole propilenico e dimetilsolfossido (2)(10), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente. Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

1.3.3 **Procedura**

1.3.3.1 *Protocollo sperimentale*

Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

- *Giorno 1:*

Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente. Cominciare l'applicazione di 25 µl della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (pertinente), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

- *Giorni 2 e 3:*

Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

- *Giorni 4 e 5:*

Nessun trattamento.

- *Giorno 6:*

Registrare il peso di ciascun animale. Iniettare 250 µl di soluzione salina tampone fosfato (PBS) contenente 20 µCi (7.4e + 8 Bq) di <sup>3</sup>H-metil timidina a tutti i topi trattati e di controllo, attraverso la vena caudale. In alternativa, iniettare 250 µL di PBS contenente 2 µCi (7.4e + 7 Bq) di <sup>125</sup>I-iododeossiridina e 10<sup>-5</sup> M fluorodeossiridina a tutti i topi, attraverso la vena caudale.

Cinque ore dopo, gli animali vanno soppressi. I linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie vengono asportati e posti in soluzione salina tampone fosfato raggruppati per gruppo sperimentale (sistema del gruppo di trattamento), oppure per ciascun animale separatamente (sistema del singolo animale). I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano nell'Allegato I della voce bibliografica 10.

1.3.3.2 *Preparazione delle sospensioni cellulari*

Mediante delicata disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 µm si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali, provenienti dai gruppi di trattamento oppure bilateralmente da singoli individui. Le cellule linfonodali vanno lavate due volte con abbondante PBS e precipitate con acido tricloroacetico al 5 % (TCA) a 4 °C per 18 ore (1). I granuli vanno poi rimessi in sospensione in 1 ml di TCA e quindi trasferiti in fiale di scintillazione contenenti 10 ml di liquido di scintillazione per il conteggio del <sup>3</sup>H, oppure trasferiti direttamente in tubi per conteggio gamma per il conteggio dello <sup>125</sup>I.

1.3.3.3 *Determinazione della proliferazione delle cellule (radioattività incorporata)*

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



1.3.3.4 Osservazioni

1.3.3.4.1 Osservazioni cliniche

Gli animali vanno osservati attentamente una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun animale.

1.3.3.4.2 Peso corporeo

Come illustrato nella sezione 1.3.3.1, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali, occorre misurare il peso dei singoli esemplari.

1.3.4 **Calcolo dei risultati**

I risultati vengono espressi mediante l'indice di stimolazione (SI). Se si applica il sistema del gruppo di trattamento, l'SI si ottiene dividendo l'incorporazione radioattiva per ciascun gruppo di trattamento per l'incorporazione del gruppo di controllo trattato con veicolo; si ottiene così un SI medio. Quando si utilizza l'approccio a singolo animale, l'SI si ottiene dividendo i valori medi delle DPM per animale calcolate per ogni gruppo di trattamento compreso il gruppo di controllo positivo, per le medie delle DPM per animale calcolate per il gruppo di controllo trattato solo con il veicolo. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con solo veicolo è 1.

L'uso dell'approccio a singolo animale per calcolare l'SI consentirà di eseguire un'analisi statistica dei dati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o una analisi statistica non parametrica. Un approccio adeguato per interpretare i dati consiste nel valutare tutti i dati singoli dei soggetti trattati e dei controlli trattati con veicolo, e nel ricavare da essi la curva dose-risposta più adeguata, tenendo conto dei limiti fiduciali (8)(12)(13). Lo sperimentatore deve però prestare attenzione a possibili risposte "aberranti" per singoli animali all'interno di un gruppo che possano richiedere l'uso di una misura alternativa della risposta (ad es. del valore mediano anziché della media) o l'eliminazione dell'osservazione aberrante.

Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione  $\geq 3$  unito alla considerazione della dose-risposta e, ove pertinente, della significatività statistica (3)(6)(8)(12)(14).

Qualora fosse necessario chiarire i risultati ottenuti, occorre prendere in considerazione diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate nei dettagli in altra sede (7).

2. **DATI**

I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori medi e individuali delle disintegrazioni per minuto (DPM) e gli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose (compreso quello di controllo con veicolo).

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELSAGGIO

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

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

Veicolo:

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

Animali sperimentali:

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

Condizioni del saggio:

- dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;
- giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati dello studio di definizione dell' intervallo di concentrazioni, se eseguito; concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua).

Controllo dell'affidabilità:

- riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usati;
- dati sui controlli positivi e negativi, contemporanei e/o storici, per il laboratorio di prova.

Risultati:

- peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e alla soppressione programmata;
- tabella dei valori di DPM medi (sistema del gruppo di trattamento) o individuali (sistema del singolo animale) come pure l'intervallo dei valori per entrambi i sistemi e degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose (compreso quello di controllo con solo veicolo);
- analisi statistica ove pertinente;
- momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'irritazione cutanea nel punto di applicazione e la somministrazione, per ciascun animale.

Discussione dei risultati:

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

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165-169.
- (2) Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93, 13-31.

- (3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563-79.
- (4) Metodo di prova B.6.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49-59.
- (9) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281-4.
- (10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- (11) Metodo di prova B.4.
- (12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63-67.
- (13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC<sub>3</sub> values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261-266.
- (14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344-48.



EUROPEAN COMMISSION  
DIRECTORATE GENERAL JRC  
JOINT RESEARCH CENTRE  
Institute for Health and Consumer Protection  
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

**SCREENING TEST  
PER IRRITANTI OCULARI CORROSIVI o SEVERI**

**ESAC Statement**

**ESAC statement on the conclusions of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU(R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach**

At its 26<sup>th</sup> Meeting, held on 26-27 April 2007 at the *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), Ispra, Italy, the *non-Commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee* (ESAC)<sup>1</sup> unanimously endorsed the following statement:

1. With regard to the results and conclusions from the ICCVAM retrospective study<sup>2,3</sup> on:

‘Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU(R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach’

ESAC endorses the following conclusion:

There are sufficient data to support the use of the *Bovine Corneal Opacity and Permeability* (BCOP) test method, and the *Isolated Chicken Eye* (ICE) test method in appropriate circumstances and with certain limitations<sup>3</sup>, as screening tests to identify substances as ocular corrosives and severe irritants in a tiered-testing strategy, as part of a weight-of-evidence approach.

2. With regard to the *Isolated Rabbit Eye* assay (IRE) and the *Hen’s Egg Test – Chorio-Allantoic Membrane* assay (HET-CAM), ESAC recommends that further work should be performed before a statement on their validity can be made.

It should be noted, however, that European authorities previously stated that while all four tests were not yet validated, *positive outcomes from these tests could be used as the basis for classifying and labelling substances as severe eye irritants* (R41)<sup>4</sup>.

Thomas Hartung  
Head of Unit, ECVAM  
Institute for Health & Consumer Protection  
Joint Research Centre, European Commission  
Ispra (Italy)

27 April 2007

\*\*\*\*\*

1. The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from the EU Members States, industry, academia and animal welfare, together with representatives of the relevant Commission services.

This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

Ms Sonja Beken (Belgium)  
 Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)  
 Mr Tõnu Püssa (Estonia)  
 Mr Lionel Larue (France)  
 Mr Manfred Liebsch (Germany)  
**Ms Annalaura Stammati** (Italy)  
 Mr Jan van der Valk (The Netherlands)  
 Mr Constantin Mircioiu (Romania)  
 Mr Albert Breier (Slovakia)  
 Ms Argelia Castaño (Spain)  
 Mr Patric Amcoff (Sweden)  
 Mr Jon Richmond (UK)  
 Mr Carl Westmoreland (COLIPA)  
 Ms Vera Rogiers (ECOPA)  
 Ms Nathalie Alépée (EFPIA)  
 Mr Robert Combes (ESTIV)  
 Mr Hasso Seibert (European Science Foundation)

The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)  
 Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)  
 Ms Elke Anklam (Director of IHCP)  
 Ms Susanna Louhimies (DG Environment)  
 Ms Barbara Mentré (DG ENTR)  
 Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)  
 Mr Christian Wimmer (DG Research)  
 Mr Hajime Kojima (JACVAM)  
 Ms Laurence Musset (OECD)  
 Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)  
 Mr William Stokes (NICEATM, USA)

2. 'Background Review Documents on *In vitro* test methods for detecting ocular corrosives and severe irritants':
  - o Bovine Corneal Opacity and Permeability test;
  - o Isolated Rabbit Eye test;
  - o Hen's Egg Test – Chorio-Allantoic Membrane test;
  - o Isolated Chicken Eye test.

Website: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd.htm)
3. The 'ICCVAM Test Method Evaluation Report on In vitro test methods for detecting ocular corrosives and severe irritants'.  
 Website: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmer.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm)
4. EC (2004). Manual of Decisions for Implementation of the 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> Amendments to Directive 67/548/EEC on Dangerous Substances. Updated version of July 2004. 189pp. Ispra, Italy: European Chemicals Bureau, European Commission JRC.
5. Website: [http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/New-Chemicals/Manual\\_of\\_decisions.pdf](http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/New-Chemicals/Manual_of_decisions.pdf)

**SCREENING TEST  
PER IRRITANTI CUTANEI**

**ESAC Statement**

**STATEMENT ON THE VALIDITY OF *IN-VITRO* TESTS FOR SKIN IRRITATION**

At its 26<sup>th</sup> meeting, held on 26-27<sup>th</sup> April, 2007 at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Italy, the non-Commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)<sup>1</sup> unanimously endorsed the following statement:

After a review of scientific reports and peer reviewed publications on the following range of *in-vitro* tests, which had been subjected to a full validation study:

1. EpiDerm (with MTT reduction and IL-1<sub>α</sub> release);
2. EPISKIN (with MTT reduction and IL-1<sub>α</sub> release);

of these, the EPISKIN method showed evidence of being a reliable and relevant stand-alone test for predicting rabbit skin irritation, when the endpoint is evaluated by MTT reduction, and for being used as a replacement (**based on the performance of the assay as specified in the annex**) for the Draize Skin Irritation Test (OECD TG 404 & Method B.4 of Annex V to Directive 67/548/EEC) for the purposes of distinguishing between R38 skin irritating and no-label (non-skin irritating) test substances. At the present time, the IL-1<sub>α</sub> endpoint should be regarded as a useful adjunct to the MTT assay, as it has the potential to increase the sensitivity of the test, without reducing its specificity. This endpoint could be used to confirm negatives obtained with the MTT endpoint.

At this time, due to its high specificity, the EpiDerm model reliably identifies skin irritants, but negative results may require further testing (e.g. according to the tiered strategy, as described in the OECD TG 404). Improvement of the EpiDerm protocol should be made to increase the level of sensitivity.

This endorsement takes account of the dossiers prepared for peer review; the views of independent experts who evaluated the dossiers against defined validation criteria; supplementary submissions made by the Management Team; and the considered view of the Peer Review Panel appointed to oversee the process.

27 April 2007

Thomas Hartung  
Head of Unit, ECVAM  
Institute for Health & Consumer Protection  
Joint Research Centre, European Commission  
Ispra, Italy

.....

1. The ESAC was established by the European Commission, and is composed of nominees from the EU Members States, industry, academia and animal welfare, together with representatives of the relevant Commission services.

This statement was endorsed by the following members of the ESAC:

Ms Sonja Beken (Belgium)  
 Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)  
 Mr Tõnu Püssa (Estonia)  
 Mr Lionel Larue (France)  
 Mr Manfred Liebsch (Germany)  
**Ms Annalaura Stammati** (Italy)  
 Mr Jan van der Valk (The Netherlands)  
 Mr Constantin Mircioiu (Romania)  
 Mr Albert Breier (Slovakia)  
 Ms Argelia Castaño (Spain)  
 Mr Patric Amcoff (Sweden)  
 Mr Jon Richmond (UK)  
 Mr Carl Westmoreland (COLIPA)  
 Ms Vera Rogiers (ECOPA)  
 Ms Nathalie Alépée (EFPIA)  
 Mr Robert Combes (ESTIV)  
 Mr Hasso Seibert (European Science Foundation)

The following Commission Services and Observer Organisations were involved in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)  
 Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)  
 Ms Elke Anklam (Director of IHCP)  
 Ms Susanna Louhimies (DG Environment)  
 Ms Barbara Mentré (DG ENTR)  
 Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)  
 Mr Christian Wimmer (DG Research)  
 Mr Hajime Kojima (JACVAM)  
 Ms Laurence Musset (OECD)  
 Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)  
 Mr William Stokes (NICEATM, USA)

## Annex

### General information on the ECVAM skin irritation validation study

After extensive optimisation and prevalidation activities (see background to the SIVS here below), ECVAM launched a formal validation study on three *in vitro* test systems in 2003. Two of the assays employed reconstituted human epidermis models (EPISKIN, EpiDerm) and one, the skin integrity function test (SIFT) employed *ex vivo* mouse skin. The aim of the study was to replace the regulatory Draize skin irritation test (EU B. 4 method; OECD TG 404) currently performed on albino rabbits by assessing the relevance (predictive capacity) and reliability (reproducibility within and between laboratories) of these test systems with a set of 58 coded test chemicals. The goal of the study was to evaluate if the *in vitro* tests would predict *in vivo* classification according to the EU classification system using the risk phrase R38 for skin irritants and no classification for non irritants. In addition, the chemical selection was representative for the three categories [strong (category 2), mild (category 3) and non-irritants (no category)] of the Globally Harmonised classification System (GHS) for permitting a post-hoc evaluation of the results according to GHS. The validation study was conducted according to the principles and criteria documented in the OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (No. 34). Furthermore, to ensure a high quality of the commercially produced human skin models, the facilities of the producers of the human skin models EPISKIN and EpiDerm were evaluated by independent auditors at the beginning of the ECVAM Skin Irritation Validation Study (SIVS).

The study was sponsored by ECVAM, coordinated by a main contractor (ZEBET-BfR, Germany) and managed by a Management Team (MT; see table 1 for the composition of MT).

**Table 1.** *Composition of the Management Team of the SIVS*

Chair (Dr Phil Botham)
Co-chair (Dr Julia Fentem)
Sponsor representative (Dr Valérie Zuang, <i>alternate</i> : Dr Chantra Eskes)
Independent biostatistician (Dr Sebastian Hoffmann)
Representative of the main contractor (Dr Horst Spielmann)
Representative of the CSSC (Dr Andrew Worth)
ECB customer (Dr Thomas Cole)
<i>Representatives of the test systems:</i>
EPISKIN (Dr Roland Roguet)
EpiDerm (Dr Manfred Liebsch)
SIFT (Dr Jon Heylings)
<i>Observers from the US:</i>
ICCVAM (Dr Karen Hamernik; <i>alternate</i> : Dr Abby Jacobs)
NICEATM (Dr William Stokes; <i>alternate</i> : Dr Ray Tice)

A Chemicals Selection Sub-Committee (CSSC) was appointed to identify test chemicals to be used in the SIVS having high quality existing *in vivo* data with which to correlate the *in vitro* measurements. Since chemicals from the European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) database of reference chemicals for skin irritation/skin corrosion had been extensively used in the preceding studies, the CSSC was requested to make use of novel sources for potential test chemicals. For this purpose chemicals were selected from the New Chemicals Database (NCD) which is the central archive within the EU notification scheme for new commercial chemicals. In addition, existing chemicals readily available from major manufacturing and/or distribution sources were selected from alternative databases such as the Toxic Substance Control Act (TSCA) database maintained by the US Environmental Protection Agency (EPA) and the ECETOC database, excluding those chemicals used in the previous optimisation and prevalidation phases.



if the viability after 15 minutes of exposure and 42 hours of post-treatment incubation is more (>) than 50%, and the amount of IL-1 release is less or equal ( $\leq$ ) to 60pg/ml.

The predictive capacities of the assays in this second phase are shown in Table 2. The within-laboratory reproducibility of classifications over three independent experiments meeting the acceptance criteria was 93.9% for EPISKIN (MTT) and 96.0% for EpiDerm (MTT). The between-laboratory reproducibility measured as the proportion of identical median classifications between laboratories was 89.5% for EPISKIN (MTT) and 88.5% for EpiDerm.

Table 2. Predictive capacities of EPISKIN and EpiDerm (MTT: based on the median classification per laboratory; MTT+IL1\_: based on the classification derived from the mean viability of the independent experiments per chemical and laboratory)

	EPISKIN (MTT)	EPISKIN (MTT+IL1-_)	EpiDerm (MTT)*
<i>Sensitivity</i>	74.7%	90.7%	57.3%
<i>Specificity</i>	80.8%	78.8%	83.8%
<i>Concordance/Accuracy</i>	78.2%	83.0%	72.4%

\*The addition of IL-1\_ to the EpiDerm protocol gave no improvement to the outcome

The study was forwarded to the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) with a proposal that EPISKIN could be considered as a replacement for the rabbit skin irritation method and EpiDerm as a constituent of a testing strategy.

#### Background to the ECVAM skin irritation validation study

In 1998, the ECVAM Skin Irritation Task Force published a report on the actual status of *in vitro* skin irritation testing and proposed 10 "challenge chemicals" for which promising, concordant *in vivo* data from the rabbit test, *in vivo* data from 4hr human patch test, and *in vitro* data from the human skin model EpiDerm were available. Proponents of new *in vitro* test systems were encouraged to submit data obtained with new *in vitro* skin irritation test protocols for these chemicals (1) for assessment whether these tests could be considered in an ECVAM prevalidation study. At the same time the suitability of various endpoints for prediction of human skin irritation was evaluated in an EU 4<sup>th</sup> framework collaborative project in several human reconstructed skin models, revealing cell viability reduction (MTT reduction) and IL-1 release the most promising endpoints. Because MTT reduction and IL-1 release showed a high inter-correlation, and IL-1 release was more variable, MTT-reduction was proposed to be the best endpoint for human skin models (2).

Of the test systems for which data were submitted to the ECVAM TF, five tests [perfused pig-ear, Prediskin, SIFT, EPISKIN, EpiDerm] had been considered promising for participation in the ECVAM prevalidation study. However, during the prevalidation study, two tests failed already in phase 2 due to insufficient reproducibility, whereas the other tests [SIFT, EPISKIN and EpiDerm] showed a sufficient intra- and interlaboratory reproducibility, but failed in their ability to correctly predict the skin irritation potential of 20 chemicals that were tested in phase 3 of the ECVAM prevalidation study (3). The ECVAM Management Team of the study therefore proposed refinement and optimisation of these three tests before considering them for formal validation.

In 2001, the ECVAM Skin Irritation Task Force and the laboratories responsible for the refinement of the tests met again and discussed ways forward to approach formal validation. In addition, since a post hoc analysis of prevalidation data for MTT reduction for EPISKIN and EpiDerm revealed similar sensitivity, it was recommended to develop a common test protocol for both skin models before the start of a formal validation study (4).

In November 2002, the ECVAM Skin Irritation Task Force (TF) discussed the refinements of the SIFT (5) and the skin model tests (6) and came to the conclusion that processing the tests to formal validation could be recommended. However, because all refinements were made using the 20 chemicals from the prevalidation study, the TF recommended to perform the SIVS in two phases: a first phase (phase 1) for the confirmation of the refinements made by the leading labs Syngenta (SIFT), L'ORÉAL (EPISKIN), and ZEBET (EpiDerm) by testing new chemicals in a controlled way under blind conditions. If the outcome of phase 1 were still promising, the tests would proceed to a second phase (phase 2), i.e. in a blind trial involving three laboratories per test.

During 2003, the EPISKIN test was further refined by L'OREAL by extending the post incubation period of the tissues (after 15 min chemical exposure) to 42 hours which allowed significant effects to increase, and recovery from weak effects.

In May 2003, an ECVAM Stakeholder Workshop recommended to conduct a formal validation study and to concentrate on the predictions of the EU classification system (R38 vs. no label), because the tests were developed and optimised for this classification scheme. L'ORÉAL and ZEBET collaborated then in developing a common test protocol to be used in the ECVAM SIVS, and evaluated it first with the 20 'challenge' chemicals of the ECVAM prevalidation study. In 2004, upon request of the ECVAM SIVS Management Team and in parallel to performing phase 1 of the SIVS, the database was further increased by testing all non-corrosive chemicals recommended in the ECETOC reference data base (ECETOC report No. 66). The data obtained in both skin models with the optimised common protocol were very promising, and published back to back in 2005 (7,8). The BfR was contracted in November 2003 further to the publication of a call for tender for the ECVAM SIVS by the European Commission in June 2003. The study started formally with the 1<sup>st</sup> Meeting of the SIVS Management Team (MT) on 17-18 November 2003.

Manuscripts on the outcome of the skin irritation validation study and on the chemicals selection, are currently being finalised for publication.

### References

1. Botham, P.A., Lesley, K.E., Fentem, J.H., Roguet, R and J.J.M. van de Sandt (1998) Alternative Methods for Skin Irritation Testing: the Current Status. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 1, *ATLA* **26**, 195-211
2. Faller, C., Bracher, M., Dami, N. and R. Roguet (2002) Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for assessment of Skin Irritation of cosmetics. *Toxicology In vitro* **16**, 557-572
3. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliott, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., van de Sandt, J.J.M. and P.A. Botham (2001) A prevalidation study on *in vitro* tests for acute Skin Irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicology In vitro* **15**, 57-93
4. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliott, G. R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and A.P Worth (2002) Follow-up to the ECVAM prevalidation study on the *in vitro* tests for acute Skin Irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* **30**, 109-129
5. Heylings J.R., Diot S., Esdaile D.J., Fasano W.J., Manning L.A. & Owen H.M. (2003). A prevalidation study on the *in vitro* irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation *in vivo*: results and evaluation of ECVAM phase III. *Toxicology In Vitro* **17**, 123-138.
6. Kandárová H., Liebsch M., Genschow E., Gerner I., Traue D., Slawik B. & Spielmann H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* **21**, 107-114.
7. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and H. Spielmann (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on the Skin Irritation Tests - An assessment of the performance of the optimised Test. *ATLA* **33**, 351-367
8. Cotovió, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and G. Rubinstein (2005) The *in vitro* acute Skin Irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* **33**, 329-249