

«B.47 Metodo di prova dell'opacità e della permeabilità della cornea nei bovini per l'identificazione di i) sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari e ii) sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari

INTRODUZIONE

Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 437 (2013). Il metodo di prova dell'opacità e della permeabilità della cornea nei bovini (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) è un metodo di prova valutato dal Comitato di coordinamento interagenzia per la convalida dei metodi alternativi (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM), in collaborazione con il Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) e del corrispondente organismo del Giappone (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) nel 2006 e nel 2010 (1) (2). Nella prima valutazione il metodo di prova BCOP è stato valutato per la sua utilità nell'identificare sostanze chimiche (sostanze e miscele) che inducono gravi lesioni oculari (1). Nella seconda valutazione il metodo di prova BCOP è stato valutato per la sua utilità nell'identificare sostanze chimiche (sostanze e miscele) non classificate che inducono irritazione oculare o gravi lesioni oculari (2). La banca dati di validazione del metodo BCOP conteneva complessivamente 113 sostanze e 100 miscele (2) (3). Tali valutazioni e i relativi esami *inter pares* hanno permesso di concludere che il metodo di prova può identificare correttamente le sostanze chimiche (sostanze e miscele) che inducono gravi lesioni oculari (categoria 1) nonché quelle che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari, secondo la definizione del Sistema generale armonizzato di classificazione e di etichettatura dei prodotti chimici delle Nazioni Unite (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — UN GHS) (4) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ⁽¹⁾ e la validità scientifica del metodo di prova è stata riconosciuta per entrambe le finalità. Per gravi lesioni oculari s'intendono lesioni dei tessuti oculari o un grave deterioramento della vista conseguente all'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, non totalmente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione. Le sostanze chimiche in esame che inducono gravi lesioni oculari sono classificate nella categoria UN GHS 1. Le sostanze chimiche non classificate in termini di irritazione oculare o gravi lesioni oculari sono definite come quelle sostanze che non soddisfano quanto prescritto per la classificazione nella categoria UN GHS 1 o 2 (2A o 2B), ovvero sono definite "senza categoria" da tale sistema. Il presente metodo di prova include l'uso raccomandato e le limitazioni del metodo di prova BCOP sulla base delle valutazioni ottenute. Le principali differenze fra la versione originale del 2009 e quella aggiornata nel 2013 della linea guida dell'OCSE riguardano fra l'altro: l'uso del metodo di prova BCOP per identificare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione secondo il sistema GHS delle Nazioni Unite (paragrafi 2 e 7); chiarimenti circa l'applicabilità del metodo di prova BCOP per la prova di alcoli, chetoni e sostanze solide (paragrafi 6 e 7) e delle sostanze e delle miscele (paragrafo 8); chiarimenti sulle modalità di prova delle sostanze tensioattive e delle miscele contenenti tensioattivi (paragrafo 28); aggiornamenti e chiarimenti relativi ai controlli positivi (paragrafi 39 e 40); un aggiornamento dei criteri decisionali relativi al metodo di prova BCOP (paragrafo 47); un aggiornamento dei criteri di accettazione dello studio (paragrafo 48); un aggiornamento degli elementi della relazione sulla prova (paragrafo 49); un aggiornamento delle definizioni contenute nell'appendice 1; l'aggiunta dell'appendice 2 relativa alla capacità predittiva del metodo di prova BCOP secondo diversi sistemi di classificazione; un aggiornamento dell'appendice 3 relativa all'elenco delle sostanze chimiche per la verifica della prestazione; e un aggiornamento dell'appendice 4 relativa al supporto corneale per il metodo di prova BCOP (paragrafo 1) e all'opacimetro (paragrafi 2 e 3).

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

Attualmente è generalmente riconosciuto che nel prossimo futuro nessuna singola prova di irritazione oculare in vitro sarà in grado di sostituire il test di Draize in vivo per prevedere tutta la gamma di irritazione per diverse classi chimiche. Tuttavia combinazioni strategiche di diversi metodi alternativi nell'ambito di una strategia di prova (sequenziale) possono sostituire il test oculare di Draize (5). L'approccio top-down (5) è usato quando, in base alle informazioni esistenti, si prevede che una sostanza chimica abbia un elevato potenziale di irritazione, mentre l'approccio bottom-up (5) è usato quando, in base alle informazioni esistenti, si prevede che una sostanza chimica non causi un'irritazione oculare sufficiente da richiedere una classificazione. Il metodo di prova BCOP è un metodo di prova in vitro che può essere usato in alcune circostanze e con limitazioni specifiche per la classificazione dei rischi oculari e l'etichettatura delle sostanze chimiche. Anche se da solo non è considerato un valido sostituto del test in vivo sugli occhi dei conigli, il metodo di prova BCOP è raccomandato come fase iniziale nell'ambito di una strategia sperimentale, quale l'approccio top-down proposto da Scott *et al.* (5) per identificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari, ossia le sostanze chimiche da classificare nella categoria UN GHS 1, senza effettuare ulteriori prove (4). Il metodo di prova BCOP è altresì raccomandato per identificare le sostanze chimiche che non richiedono una classificazione per irritazione oculare o per gravi lesioni oculari, secondo la definizione del sistema GHS delle Nazioni Unite ("senza categoria" nel sistema UN GHS) (4) nell'ambito di una strategia di prova quale l'approccio bottom-up (5). Tuttavia, la classificazione definitiva di una sostanza chimica cui non si attribuisce la possibilità di causare gravi lesioni oculari o non classificata per irritazione oculare/gravi lesioni oculari con il metodo di prova BCOP richiederebbe prove supplementari (in vitro e/o in vivo).

Scopo di questo metodo di prova è descrivere le procedure impiegate per valutare il potenziale di pericolo per gli occhi di una sostanza chimica in esame sulla base della capacità di tale sostanza di indurre opacità e aumentare la permeabilità di una cornea isolata di bovino. Gli effetti tossici sulla cornea sono misurati attraverso: i) diminuzione della trasmissione della luce (opacità), e ii) aumento del passaggio del colorante a base di fluoresceina sodica (permeabilità). Le valutazioni di opacità e permeabilità della cornea successivamente all'esposizione a una sostanza chimica in esame vengono combinate per ottenere un punteggio di irritazione in vitro (*In Vitro Irritancy Score* — IVIS), utilizzato per classificare il livello di irritazione provocato dalla sostanza chimica in esame.

Le definizioni di questi parametri figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

Questo metodo di prova è basato sul protocollo del metodo di prova ICCVAM BCOP (6) (7), in origine elaborato dalle informazioni ottenute dal protocollo dell'Institute for in vitro Sciences (IIVS) e dal protocollo INVITTOX 124 (8). Quest'ultimo rappresenta il protocollo usato nello studio di prevalidazione condotto negli anni 1997-1998 e finanziato dalla Comunità europea. Entrambi i protocolli erano basati sul metodo di prova BCOP inizialmente trattato da Gautheron *et al.* (9).

Il metodo di prova BCOP può essere usato per identificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari, secondo la definizione UN GHS, ossia le sostanze chimiche da classificare nella categoria UN GHS 1 (4). Se usato a tali fini, il metodo di prova BCOP presenta un'accuratezza complessiva del 79 % (150/191), una percentuale di falsi positivi del 25 % (32/126) e una percentuale di falsi negativi del 14 % (9/65), rispetto ai dati ottenuti con il test in vivo sugli occhi dei conigli classificati secondo il sistema di classificazione UN GHS (3) (cfr. appendice 2,

tabella 1). Se le sostanze chimiche in esame nell'ambito di alcune classi chimiche (per es. alcoli, chetoni) o fisiche (per es. solidi) sono escluse dalla banca dati, il metodo di prova BCOP presenta un'accuratezza complessiva dell'85 % (111/131), una percentuale di falsi positivi del 20 % (16/81) e una percentuale di falsi negativi dell'8 % (4/50) secondo il sistema di classificazione UN GHS (3). Le lacune potenziali del metodo di prova BCOP quando è usato per identificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1) sono basate sulle elevate percentuali di falsi positivi per gli alcoli e i chetoni nonché sulle elevate percentuali di falsi negativi per i solidi osservate nella banca dati di validazione (1)(2)(3). Tuttavia, poiché non tutti gli alcoli e i chetoni sono sovrastimati dal metodo di prova BCOP e alcuni sono stimati correttamente nella categoria UN GHS 1, questi due gruppi funzionali organici non sono considerati esterni all'ambito d'applicazione del metodo di prova. Spetta all'utilizzatore di questo metodo di prova decidere se un'eventuale sovrastima di un alcol o di un chetone possa essere accettata o se sia necessario effettuare prove supplementari con un metodo basato sul peso dell'evidenza. Per quanto attiene alle percentuali di falsi negativi per i solidi, è opportuno osservare che i solidi possono generare condizioni di esposizione variabili ed estreme nel test di Draize in vivo, il che può falsare il reale potenziale di irritazione (10). Va altresì osservato che nessuno dei falsi negativi identificati nella banca dati di validazione ICCVAM (2) (3), nell'ambito dell'identificazione delle sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1), ha prodotto un risultato $IVIS \leq 3$, ossia il criterio usato per identificare una sostanza chimica in esame come "senza categoria" nel sistema UN GHS. Inoltre, i falsi positivi BCOP in questo contesto non sono fondamentali poiché tutte le sostanze chimiche in esame che producono un risultato $3 \leq IVIS \leq 55$ sarebbero successivamente sottoposte a prova con altri metodi in vitro adeguatamente validati o, in *ultima ratio* sui conigli, a seconda dei requisiti regolamentari, mediante una strategia di saggi sequenziali con un metodo basato sul peso dell'evidenza. Considerato che alcuni solidi chimici sono stimati correttamente con il metodo di prova BCOP come appartenenti alla categoria UN GHS 1, nemmeno tale stato fisico è ritenuto esterno all'ambito di applicazione del metodo di prova. Gli sperimentatori potrebbero prendere in considerazione il ricorso a tale metodo per tutti i tipi di sostanze chimiche, laddove un risultato $IVIS > 55$ dovrebbe essere accettato come indicativo di una risposta che induce gravi lesioni oculari tale da essere classificata nella categoria UN GHS 1, senza ulteriori prove. Come già precisato, i risultati positivi ottenuti con alcoli o chetoni andrebbero tuttavia interpretati con cautela, considerato il rischio di sovrastima.

Il metodo di prova BCOP può inoltre essere usato per identificare le sostanze chimiche che non richiedono una classificazione per irritazione oculare o per gravi lesioni oculari nell'ambito del sistema di classificazione UN GHS (4). Se usato a tali fini, il metodo di prova BCOP presenta un'accuratezza complessiva del 69 % (135/196), una percentuale di falsi positivi del 69 % (61/89) e una percentuale di falsi negativi dello 0 % (0/107), rispetto ai dati ottenuti con il test in vivo sugli occhi dei conigli classificati secondo il sistema di classificazione UN GHS (3) (cfr. appendice 2, tabella 2). La percentuale di falsi positivi ottenuta è notevolmente elevata (le sostanze chimiche "senza categoria" nel sistema UN GHS in vivo che producono un risultato $IVIS > 3$, cfr. paragrafo 47), ma in questo contesto non è fondamentale poiché tutte le sostanze chimiche in esame che producono un risultato $3 \leq IVIS \leq 55$ sarebbero successivamente sottoposte a prova con altri metodi in vitro adeguatamente validati o, in *ultima ratio* sui conigli, a seconda dei requisiti regolamentari, mediante una strategia di saggi sequenziali con un metodo basato sul peso dell'evidenza. Il metodo di prova BCOP non mostra lacune specifiche per quanto riguarda le prove di alcoli, chetoni e solidi se il fine è identificare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione per l'irritazione oculare o gravi lesioni oculari ("senza categoria" nel sistema UN GHS)(3). Gli sperimentatori potrebbero prendere in considerazione il ricorso a tale metodo di prova per tutti i tipi di sostanze chimiche, laddove un risultato negativo ($IVIS \leq 3$) dovrebbe essere accettato come indicativo del fatto che non è necessaria alcuna classificazione ("senza categoria" nel sistema UN GHS). Poiché il metodo di prova BCOP può solo identificare correttamente il 31 % delle sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari, questo metodo di prova non dovrebbe costituire la prima scelta per avviare un approccio bottom-up (5), se sono disponibili altri metodi in vitro validati e accettati aventi un'analogia elevata sensibilità ma una maggiore specificità.

La banca dati di validazione del metodo BCOP conteneva complessivamente 113 sostanze e 100 miscele (2) (3). Il metodo di prova BCOP è pertanto ritenuto applicabile per le prove sia delle sostanze che delle miscele.

Il metodo di prova BCOP non è raccomandato per identificare le sostanze chimiche in esame da classificarsi come irritanti per gli occhi (categoria UN GHS 2 o 2A) o le sostanze chimiche in esame da classificarsi come moderatamente irritanti per gli occhi (categoria UN GHS 2B) a causa dell'elevato numero di sostanze chimiche appartenenti alla categoria UN GHS 1 sottoclassificate nelle categorie 2, 2A o 2B e di sostanze chimiche "senza categoria" nel sistema UN GHS sovraclassificate nelle categorie 2, 2A o 2B (2) (3). A tal fine possono essere necessarie ulteriori prove con un altro metodo adeguato.

Tutte le procedure che prevedono l'impiego di occhi e cornee di bovini devono osservare le regolamentazioni e le procedure in vigore nella struttura che effettua l'analisi relativamente alla gestione dei materiali di derivazione animale che comprendono, tra l'altro, i tessuti e i liquidi tessutali. È consigliabile adottare le comuni norme di cautela osservate nei laboratori (11).

Sebbene il metodo di prova BCOP non prenda in considerazione le lesioni della congiuntiva e dell'iride, esso riguarda gli effetti sulla cornea, che sono i principali fattori di classificazione in vivo nel sistema UN GHS. Il metodo di prova BCOP di per sé non consente di valutare la reversibilità delle lesioni corneali. Studi condotti sugli occhi dei conigli suggeriscono di esaminare la profondità iniziale di una lesione corneale per identificare alcuni tipi di effetti irreversibili (12). Tuttavia è necessario un approfondimento scientifico per comprendere in quale modo possano verificarsi effetti irreversibili non collegati all'elevato livello iniziale della lesione. Infine, il metodo di prova BCOP non consente di valutare il potenziale di tossicità sistemica associato all'esposizione attraverso l'occhio.

Infine, il metodo di prova BCOP sarà aggiornato con cadenza regolare, mano a mano che si disporrà di ulteriori dati e informazioni. A titolo di esempio, l'istopatologia presenta un'utilità potenziale nei casi in cui è necessaria una caratterizzazione più completa della lesione corneale. Come delineato nel documento orientativo dell'OCSE "OECD Guidance Document n. 160" (13), gli utilizzatori sono invitati a conservare le cornee e a preparare campioni istopatologici che possono servire a elaborare una banca dati e criteri decisionali in grado di migliorare ulteriormente l'accuratezza di questo metodo di prova.

Ai laboratori che ricorrono a questo tipo di metodo di prova per la prima volta si consiglia di utilizzare le sostanze chimiche di riferimento indicate nell'appendice 3. Un laboratorio può utilizzare tali sostanze chimiche per dimostrare le proprie competenze tecniche nell'esecuzione del metodo di prova BCOP prima di presentare i dati del metodo di prova BCOP a scopi regolamentari per la classificazione dei rischi.

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo di prova BCOP è un modello organotipico che mantiene a breve termine in vitro la normale funzionalità fisiologica e biochimica della cornea dei bovini. Questo metodo di prova è utilizzato per la valutazione dei danni prodotti dalla sostanza chimica in esame sulla base di misurazioni quantitative dei cambiamenti di opacità e permeabilità, effettuate rispettivamente con un opacimetro e uno spettrofotometro. Entrambe le misurazioni vengono impiegate per il calcolo del punteggio IVIS, utilizzato per assegnare una categoria di classificazione di pericolo di irritazione in vitro per la previsione del potenziale di irritazione oculare in vivo di una sostanza chimica in esame (cfr. criteri decisionali al paragrafo 48).

Il metodo di prova BCOP impiega cornee isolate da occhi di bovini appena macellati. L'opacità corneale si misura con la quantità di luce trasmessa attraverso la cornea. La permeabilità si misura con la quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che attraversa l'intero spessore della cornea ed è rilevata nel mezzo della camera posteriore. Le sostanze chimiche in esame vengono applicate alla superficie epiteliale della cornea e mediante aggiunta nella camera anteriore del supporto corneale. L'appendice 4 riporta una descrizione e un diagramma del supporto corneale utilizzato per il metodo di prova BCOP. I supporti corneali possono essere acquistati sul mercato da diversi fornitori o possono essere costruiti.

Origine ed età degli occhi dei bovini e selezione delle specie animali

I bovini inviati ai macelli vengono di norma abbattuti per il consumo umano o altri usi commerciali. Le cornee utilizzate per il metodo di prova BCOP provengono esclusivamente da animali sani ritenuti idonei a essere immessi nella catena alimentare umana. Poiché i capi di bestiame sono di peso diverso a seconda della razza, dell'età e del sesso, non vi sono raccomandazioni relative al peso dell'animale al momento della macellazione.

L'impiego di animali di età diversa può comportare variazioni nelle dimensioni della cornea. Le cornee di diametro orizzontale $> 30,5$ mm e spessore corneale centrale (*central corneal thickness* — CCT) $\geq 1\ 100$ μm si ottengono di norma da bovini di età superiore a otto anni, mentre le cornee che presentano un diametro orizzontale $< 28,5$ mm e un valore di CCT < 900 μm derivano solitamente da capi di bestiame di età inferiore a cinque anni (14). Per questo motivo non si utilizzano di norma occhi di bovini di età superiore a 60 mesi. Gli occhi dei bovini di età inferiore a 12 mesi di norma non sono impiegati, in quanto sono ancora in fase di sviluppo e i valori relativi allo spessore e al diametro della cornea sono notevolmente inferiori rispetto ai corrispondenti parametri rilevati nei bovini adulti. L'impiego di cornee di animali giovani (ovvero di età compresa fra 6 e 12 mesi) è tuttavia ammesso in quanto comporta alcuni vantaggi, quali la maggiore disponibilità, la limitata fascia di età e la riduzione dei rischi legati alla potenziale esposizione del lavoratore all'encefalopatia spongiforme bovina (15). Sarebbe utile valutare ulteriormente gli effetti delle dimensioni o dello spessore corneali sulla capacità di reazione a sostanze chimiche corrosive e irritanti, pertanto si raccomanda agli utilizzatori di indicare la stima dell'età e/o del peso degli animali da cui provengono le cornee utilizzate in uno studio.

Prelievo e trasporto degli occhi in laboratorio

Gli occhi sono prelevati dai dipendenti del mattatoio. Per minimizzare i danni meccanici e di altro tipo agli occhi, questi dovrebbero essere enucleati non appena possibile dopo la morte e raffreddati immediatamente dopo l'enucleazione e durante il trasporto. Durante il risciacquo della testa dell'animale è necessario che i dipendenti del mattatoio non facciano uso di detergenti al fine di evitare l'esposizione degli occhi a sostanze chimiche potenzialmente irritanti.

Gli occhi vanno immersi completamente nella soluzione salina bilanciata di Hank raffreddata (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBBS) in un contenitore di dimensioni adeguate e trasportati in laboratorio in modo da ridurre al minimo il relativo deterioramento e/o la contaminazione batterica. Gli occhi sono prelevati durante il processo di macellazione e potrebbero pertanto essere esposti al sangue o ad altri materiali biologici, compresi batteri e microrganismi di altra natura. Per questo motivo è importante assicurare che il rischio di contaminazione sia ridotto al minimo (per es. tenendo il contenitore degli occhi in ghiaccio durante la raccolta e il trasporto e aggiungendo antibiotici alla soluzione HBSS utilizzata per conservare gli occhi durante il trasporto [per es. penicillina a 100 IU/ml e streptomina a 100 $\mu\text{g/ml}$]).

È consigliabile ridurre al minimo l'intervallo temporale che intercorre fra il prelievo degli occhi e l'utilizzo delle cornee per il metodo di prova BCOP (idealmente, gli occhi andrebbero raccolti e utilizzati nell'arco della stessa giornata) e accertare che tale intervallo non pregiudichi i risultati del saggio. I risultati in questione si basano sui criteri di selezione degli occhi e sulle reazioni dei controlli positivi e negativi. Si suggerisce di utilizzare per il saggio occhi dello stesso gruppo di prelievo, ottenuti nella medesima giornata.

Criteri di selezione degli occhi usati nel metodo di prova BCOP

Giunti in laboratorio, gli occhi sono sottoposti a un attento esame volto a evidenziare la presenza di eventuali difetti, quali per es. aumento dell'opacità, graffi e neovascolarizzazione. Possono essere utilizzate solamente cornee provenienti da occhi privi di tali difetti.

La qualità di ciascuna cornea è valutata anche durante le fasi successive del saggio. Vanno scartate le cornee che, dopo un periodo iniziale di un'ora per ristabilire l'equilibrio, presentano un valore di opacità superiore a sette unità o equivalente per l'opacimetro e per i supporti corneali (NOTA: l'opacimetro va tarato su valori di opacità standard impiegati per definire le unità di opacità, cfr. appendice 4).

Ciascun gruppo di trattamento (sostanza chimica in esame, controlli negativi e positivi paralleli) consiste di un minimo di tre occhi. Tre cornee dovrebbero essere utilizzate per le cornee di controllo negativo nel metodo di prova BCOP. Poiché tutte le cornee sono tagliate dal bulbo intero e montate nelle camere corneali, vi è il rischio che maneggiando tali dispositivi vengano alterati i valori di opacità e permeabilità (compresi i controlli negativi). Inoltre, i valori di opacità e permeabilità delle cornee di controllo negativo sono utilizzati per correggere i valori di opacità e permeabilità corneali relativi alla sostanza chimica in esame e al controllo positivo nei calcoli IVIS.

PROCEDURA

Preparazione degli occhi

Le cornee prive di difetti sono dissezionate lasciando un bordo di 2-3 mm di sclera per permettere di maneggiarle più agevolmente in seguito e facendo attenzione a non danneggiare l'epitelio e l'endotelio corneale. Le cornee così separate sono montate in appositi supporti corneali composti da una sezione anteriore e una posteriore, che si interfacciano rispettivamente con i lati epiteliale ed endoteliale della cornea. Entrambe le camere sono riempite fino all'orlo con mezzo minimo essenziale di Eagle (EMEM) preriscaldato privo di fenolo rosso, riempiendo per prima la camera posteriore e facendo attenzione a evitare la formazione di bolle. L'apparecchio è poi equilibrato a $32 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ per almeno un'ora per consentire alle cornee di equilibrarsi con il mezzo e raggiungere per quanto possibile la normale attività metabolica (la temperatura approssimativa della superficie corneale in vivo è di $32 ^\circ\text{C}$).

Dopo il periodo di equilibratura si aggiunge il mezzo EMEM fresco preriscaldato privo di fenolo rosso in entrambe le camere e si rilevano i valori base di opacità per ciascuna cornea. Sono scartate le cornee che presentano lesioni macroscopiche dei tessuti (per es. graffi, pigmentazione, neovascolarizzazione) o un'opacità superiore a sette unità di opacità o equivalente per l'opacimetro. Almeno tre cornee sono selezionate come cornee di controllo negativo (o del solvente). Le cornee restanti sono poi allocate al gruppo di trattamento e al gruppo dei controlli positivi.

La capacità termica dell'acqua è più elevata di quella dell'aria, di conseguenza l'acqua offre condizioni di temperatura più stabili per l'incubazione. Si suggerisce pertanto di utilizzare un bagno ad acqua per mantenere il supporto corneale e il relativo contenuto a una temperatura pari a $32 (\pm 1) ^\circ\text{C}$. Si possono comunque utilizzare anche incubatori ad aria, a condizione che si adottino le necessarie cautele per il mantenimento di condizioni di temperatura stabili (per es. preriscaldando i supporti e il mezzo in essi contenuto).

Applicazione della sostanza chimica in esame

Si seguono due diversi protocolli di trattamento, uno per i liquidi e i tensioattivi (solidi o liquidi) e uno per i solidi non tensioattivi.

I liquidi sono analizzati non diluiti. Le sostanze semisolide, le creme e le cere sono di norma analizzate come liquidi. La prova sui tensioattivi non diluiti è eseguita a una concentrazione del 10 % p/v in una soluzione composta da cloruro di sodio allo 0,9 %, acqua distillata o altro solvente che abbia dimostrato di non avere ripercussioni negative sul sistema di prova. L'impiego di diluizioni diverse deve essere opportunamente motivato. Le miscele contenenti tensioattivi possono essere sottoposte a prova non diluite o diluite in opportuna concentrazione secondo il pertinente scenario di esposizione in vivo. Le concentrazioni di prova devono essere opportunamente motivate. Le cornee sono esposte ai liquidi e ai tensioattivi per 10 minuti. La scelta di altri tempi di esposizione va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Cfr. appendice 1 per una definizione di tensioattivo e di miscela contenente tensioattivi.

I solidi non tensioattivi sono di norma analizzati sotto forma di soluzioni o sospensioni a una concentrazione del 20 % p/v, in una soluzione composta da cloruro di sodio allo 0,9 %, acqua distillata o altro solvente, che abbia dimostrato di non avere ripercussioni negative sul sistema di prova. In determinate circostanze e con opportune giustificazioni scientifiche i solidi possono anche essere analizzati non diluiti e applicati direttamente sulla superficie della cornea utilizzando il metodo della camera aperta (cfr. paragrafo 32). Le cornee sono esposte ai solidi per quattro ore, mentre in caso di applicazione di liquidi e tensioattivi è possibile scegliere tempi di esposizione alternativi a condizione che vengano fornite opportune motivazioni scientifiche.

A seconda della natura fisica e delle caratteristiche chimiche della sostanza chimica in esame (per es. solidi, liquidi, liquidi viscosi o liquidi non viscosi) possono essere adottati diversi metodi di trattamento. La criticità sta nel garantire che la sostanza chimica in esame copra adeguatamente la superficie epiteliale e che venga correttamente rimossa durante il risciacquo. Il metodo della camera chiusa è di norma impiegato per sostanze chimiche in esame liquide da non viscoso a leggermente viscoso, mentre il metodo della camera aperta si utilizza di regola per sostanze chimiche in esame liquide da semiviscose a viscoso e per solidi non diluiti.

Il metodo della camera chiusa prevede l'introduzione nella camera anteriore di una sostanza chimica in esame in quantità sufficiente (750 µl) a coprire il lato epiteliale della cornea attraverso i fori di dosaggio posti sulla superficie superiore della camera. I fori sono successivamente sigillati con tappi durante l'esposizione. È importante assicurare che ciascuna cornea sia esposta alla sostanza chimica in esame per l'intervallo di tempo necessario.

Nel metodo della camera aperta, prima di eseguire il trattamento, occorre rimuovere dalla camera anteriore l'anello di chiusura della finestra e la finestra in vetro. La sostanza di controllo o in esame (750 µl o una quantità della sostanza chimica in esame sufficiente a coprire interamente la cornea) è applicata direttamente alla superficie epiteliale della cornea con una micropipetta. Se è difficile usare la pipetta per una sostanza chimica in esame, questa può essere caricata a pressione in una pipetta a spostamento positivo per agevolare il dosaggio. Il puntale di una pipetta a spostamento positivo è inserito nel puntale di erogazione della siringa al fine di caricare sotto pressione il materiale nel puntale di spostamento. Contemporaneamente, lo stantuffo della siringa è premuto man mano che il pistone della pipetta è tirato verso l'alto. Se si formano bolle d'aria nel puntale della pipetta, occorre rimuovere (espellere) la sostanza chimica e ripetere il processo finché il puntale non sarà riempito senza che si creino bolle d'aria. È possibile all'occorrenza utilizzare una normale siringa (senza ago), poiché tale metodo consente la misurazione di un volume preciso di sostanza chimica in esame e facilita l'applicazione della sostanza alla superficie epiteliale della cornea. Dopo il dosaggio, la finestra è riposizionata sulla camera anteriore per ricreare un sistema chiuso.

Incubazione post-esposizione

Dopo il periodo di esposizione la sostanza chimica in esame, la sostanza chimica usata per il controllo negativo o la sostanza chimica per il controllo positivo è rimossa dalla camera anteriore e si lava l'epitelio almeno tre volte (o comunque fino a che non restino ulteriori tracce visibili della sostanza in esame) con EMEM (contenente rosso fenolo). Si utilizza per il risciacquo il mezzo contenente rosso fenolo, in quanto è possibile monitorare l'eventuale cambiamento di colore del rosso fenolo per determinare l'efficacia del risciacquo di sostanze chimiche acide o alcaline. Le cornee sono lavate più di tre volte nel caso in cui il rosso fenolo continui a scolorirsi, divenendo giallo o porpora, o se vi siano ancora tracce visibili della sostanza chimica in esame. Non appena la sostanza chimica in esame è stata completamente eliminata, le cornee sono sottoposte a un ultimo risciacquo con EMEM (senza rosso fenolo). Si impiega l'EMEM (senza rosso fenolo) per il risciacquo finale per assicurare che il rosso fenolo sia stato completamente rimosso dalla camera anteriore prima della misurazione dell'opacità. Si riempie la camera anteriore nuovamente con EMEM fresco senza rosso fenolo.

Per i liquidi o i tensioattivi, dopo il risciacquo le cornee restano in incubazione per ulteriori due ore a una temperatura di 32 (± 1) °C. Un periodo più lungo di post-esposizione può rivelarsi utile in determinate circostanze e va valutato caso per caso. Le cornee trattate con i solidi sono risciacquate accuratamente al termine delle quattro ore di esposizione, ma non richiedono un ulteriore periodo di incubazione.

Al termine del periodo di post-incubazione per i liquidi e i tensioattivi e delle quattro ore di esposizione per i solidi non tensioattivi si registrano i valori di opacità e permeabilità di ciascuna cornea. Inoltre, ogni cornea è sottoposta a esame visivo e si registrano altre osservazioni utili (per es. desquamazione dei tessuti, presenza di residui della sostanza chimica in esame, opacità non uniforme). Queste osservazioni potrebbero essere importanti in quanto possono determinare eventuali variazioni dei dati registrati con l'opacimetro.

Sostanze chimiche usate come controlli

Ogni prova deve includere controlli positivi o negativi (solvente o mezzo disperdente) paralleli.

Nelle prove con sostanze liquide al 100 % il metodo di prova BCOP comprende un controllo negativo parallelo (per es. soluzione di cloruro di sodio allo 0,9 % o acqua distillata) al fine di rilevare eventuali cambiamenti non specifici nel sistema sperimentale e offrire una base di riferimento per i risultati del saggio. La presenza del controllo garantisce inoltre che non si verifichino reazioni irritanti a causa delle condizioni del saggio.

Nelle prove con liquidi diluiti, tensioattivi o solidi, il metodo di prova BCOP comprende un gruppo di controllo (solvente o mezzo disperdente) parallelo al fine di rilevare eventuali cambiamenti non specifici nel sistema sperimentale e offrire una base di riferimento per i risultati del saggio. Può essere utilizzato solo un solvente/mezzo disperdente che abbia dimostrato di non influire negativamente sul sistema sperimentale.

Una sostanza chimica nota per indurre una risposta positiva è inclusa come controllo positivo parallelo in ogni esperimento per verificare l'integrità del sistema di prova e del suo corretto svolgimento. Tuttavia il grado dell'irritazione non deve essere eccessivo, per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

L'etanolo al 100 % o la dimetilformammide al 100 % sono esempi di controlli positivi di sostanze chimiche in esame liquide. Un esempio di controllo positivo per le sostanze chimiche in esame solide è l'imidazolo al 20 % p/v in una soluzione composta da cloruro di sodio allo 0,9 %.

Le sostanze chimiche di riferimento sono utili per valutare il potenziale di irritazione oculare di sostanze chimiche sconosciute appartenenti a determinate classi di sostanze chimiche o prodotti o per la valutazione del potenziale di irritazione relativo di una sostanza irritante per occhi nell'ambito di una serie specifica di reazioni irritanti.

Risultati misurati

L'opacità è determinata dalla quantità di luce trasmessa attraverso la cornea. L'opacità corneale è misurata quantitativamente per mezzo di un opacimetro, che consente di ottenere valori di opacità misurati su una scala continua.

La permeabilità è determinata dalla quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che penetra negli strati cellulari della cornea (ovvero, l'epitelio sulla superficie esterna della cornea attraverso l'endotelio sulla superficie corneale interna). Si aggiunge 1 ml di soluzione di fluoresceina sodica (rispettivamente 4 o 5 mg/ml nella prova con sostanze liquide e tensioattivi o solidi non tensioattivi) alla camera anteriore del supporto corneale. Tale soluzione è a contatto con l'epitelio della cornea, mentre la camera posteriore, che è a contatto con il lato endoteliale della cornea, è riempita con EMEM fresco. Il supporto è poi messo in incubazione in posizione orizzontale per 90 (\pm 5) min a 32 (\pm 1) °C. La quantità di fluoresceina sodica che giunge alla camera posteriore è misurata attraverso la spettrofotometria UV/VIS. I dati spettrofotometrici rilevati a 490 nm sono registrati come valori di densità ottica (OD_{490}) o assorbanza e misurati su una scala continua. I valori di permeabilità della fluoresceina sono determinati utilizzando valori OD_{490} a partire da uno spettrofotometro a luce visibile impostato su una lunghezza di percorso standard di 1 cm.

In alternativa è possibile usare un lettore di piastre da microtitolazione a 96 pozzetti, purché: i) sia possibile stabilire l'intervallo lineare del lettore per determinare i valori della fluoresceina OD_{490} e ii), si usi il volume corretto di campioni di fluoresceina nella piastra a 96 pozzetti per risultare in valori OD_{490} equivalenti alla lunghezza standard del percorso di 1 cm (che potrebbe richiedere un pozzetto completamente riempito, di norma 360 μ l).

DATI E RELAZIONE

Valutazione dei dati

Appena saranno stati corretti i valori di opacità e permeabilità media (OD_{490}) con i valori dell'opacità di fondo e i valori di permeabilità OD_{490} dei controlli negativi, i valori medi di opacità e permeabilità OD_{490} relativi a ciascun gruppo di trattamento saranno utilizzati nella seguente formula empirica per il calcolo del punteggio di irritazione in vitro (IVIS) per ciascun gruppo di trattamento:

$$\text{IVIS} = \text{valore medio di opacità} + (15 \times \text{valore medio di permeabilità } OD_{490})$$

Sina *et al.* (16) precisano che questa formula è stata derivata durante studi interni e interlaboratorio. I dati generati per una serie di 36 composti nell'ambito di uno studio che ha coinvolto più laboratori sono stati oggetto di un'analisi multivariata per la determinazione dell'equazione più appropriata per la correlazione fra dati in vivo e in vitro. Gli scienziati di due diverse imprese hanno eseguito questa analisi e hanno derivato equazioni quasi identiche.

I valori di opacità e permeabilità dovrebbero essere valutati separatamente per determinare se una sostanza chimica in esame ha indotto corrosività o irritazione grave solo per uno dei due risultati (cfr. criteri decisionali).

Criteri decisionali

I valori limite IVIS per identificare le sostanze chimiche in esame come in grado di indurre gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1) e le sostanze chimiche in esame che non richiedono classificazione per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari ("senza categoria" nel sistema UN GHS) sono elencati in appresso:

IVIS	UN GHS
≤ 3	Senza categoria
> 3; ≤ 55	Non è possibile fare previsioni
> 55	Categoria 1

Criteri di accettazione dello studio

Una prova è considerata accettabile se il punteggio IVIS risultante dal controllo positivo rientra fra due deviazioni standard dalla media storica, che va aggiornata con cadenza almeno trimestrale o comunque ogni volta si effettui una prova accettabile in laboratori nei quali le prove sono svolte con scarsa frequenza (ovvero, meno di una volta al mese). Le reazioni dei controlli negativi o dei solventi/mezzi disperdenti dovrebbero corrispondere a valori di opacità e permeabilità inferiori ai limiti superiori stabiliti per i valori storici di opacità e permeabilità di cornee di bovini trattati con i relativi controlli negativi o solventi/mezzi disperdenti. Un singolo ciclo di prove costituito da almeno tre cornee dovrebbe essere sufficiente per una sostanza chimica in esame, se la classificazione che ne risulta è univoca. Tuttavia, nei casi in cui sussiste un margine di incertezza nel primo ciclo di prove, è opportuno prendere in considerazione un secondo ciclo di prove (non obbligatorio) nonché un terzo qualora emergessero risultati IVIS discordanti fra i primi due cicli di prova. In questo contesto, un risultato nel primo ciclo di prova è ritenuto incerto se le stime relative alle tre cornee si sono rivelate divergenti, come:

- le previsioni relative a 2 delle 3 cornee sono discordanti dalla media delle tre cornee, OPPURE
- la previsione relativa a 1 delle 3 cornee è discordante dalla media delle 3 cornee, E il risultato discordante si discosta di >10 unità IVIS dal valore limite di 55.
- Se il ciclo di prove ripetuto corrobora la stima del ciclo di prove iniziale (sulla base del valore medio IVIS) è possibile prendere una decisione definitiva senza ulteriori prove. Se il ciclo di prove ripetuto fornisce una stima non in linea con il ciclo di prove iniziale (sulla base del valore IVIS medio), allora è opportuno effettuare un terzo e ultimo ciclo di prove per determinare le stime corrette dubbie e classificare la sostanza chimica in esame. È possibile rinunciare alle prove supplementari di classificazione ed etichettatura se in un qualsiasi ciclo di prove si ottiene una previsione di categoria UN GHS 1.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova include le seguenti informazioni, se pertinenti alla conduzione dello studio:

Sostanze chimiche in esame e sostanze chimiche di controllo

- Denominazioni chimiche, quali le denominazioni strutturali CAS (*Chemical Abstracts Service*) seguite da altri nomi, se conosciuti; il numero di registro CAS (RN), se conosciuto;

- purezza e composizione della sostanza chimica in esame/di controllo (in percentuale ponderale), nella misura in cui l'informazione è disponibile;
- proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, quali lo stato fisico, la volatilità, il pH, la stabilità, la classe chimica e la solubilità in acqua;
- trattamento delle sostanze in esame/di controllo prima del test, se del caso (per es. riscaldamento, frantumazione);
- stabilità, se conosciuta.

Informazioni relative allo sponsor e ai centri di prova

- Nome e indirizzo dello sponsor, del centro di prova e del responsabile dello studio.

Condizioni del metodo di prova

- Opacimetro usato (per es. modello e specifiche) e relative impostazioni;
- informazioni sulla calibratura dei dispositivi usati per misurare l'opacità e la permeabilità (per es. opacimetro e spettrofotometro) per garantire la linearità delle misurazioni;
- tipo di supporti corneali usati (per es. modello e specifiche);
- descrizione delle altre attrezzature usate;
- procedura usata per garantire l'integrità (ossia l'accuratezza e l'affidabilità) del metodo di prova nel tempo (per es. prove periodiche delle sostanze chimiche per la verifica della prestazione).

Criteri di accettabilità della prova

- Serie di controlli positivi e negativi paralleli accettabili, basati su dati storici;
- se applicabili, serie di controlli di riferimento paralleli, basati su dati storici.

Prelievo e preparazione degli occhi

- Identificazione dell'origine degli occhi (ovvero, la struttura presso la quale sono stati prelevati);
- diametro della cornea come misura dell'età dell'animale di origine e idoneità al saggio;
- condizioni di conservazione e trasporto degli occhi (per es. data e ora del prelievo, intervallo di tempo prima dell'inizio della prova, mezzi di trasporto e condizioni di temperatura, eventuali antibiotici usati);
- preparazione e montaggio delle cornee bovine comprese le dichiarazioni relative alla loro qualità, alla temperatura dei supporti corneali e ai criteri per la selezione delle cornee usate nella prova.

Procedura di prova

- Numero delle repliche impiegate;
- identità dei controlli negativi e positivi impiegati (se pertinenti, anche il solvente e i controlli di riferimento);
- concentrazione/i della sostanza chimica in esame, applicazione, tempo di esposizione e periodo di incubazione post-esposizione impiegati;
- descrizione dei criteri di valutazione e decisione impiegati;
- descrizione dei criteri di accettazione dello studio impiegati;
- descrizione di qualsiasi modifica della procedura di prova;
- descrizione dei criteri di decisione impiegati.

Risultati

- Presentazione in forma tabulare dei dati relativi ai singoli campioni di prova (per es. valori di opacità e OD₄₉₀ e punteggio IVIS calcolato per la sostanza chimica in esame, i controlli positivi, negativi e di riferimento [se inclusi], compresi i dati delle prove ripetute e i valori medi ± la deviazione standard per ciascuna prova);
- descrizione di altri effetti osservati;
- classificazione nel sistema UN GHS derivata in vitro, se pertinente.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available at http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm.
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (3) OCSE (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: Nazioni Unite. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Available at: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITTOX (1999). Protocollo n. 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available at: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (13) OCSE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
- (17) Capitolo B.5 del presente allegato, Irritazione/corrosione oculare acuta.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OCSE (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Available at: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza», per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova.

Sostanza chimica di riferimento: sostanza chimica usata come standard di confronto rispetto a una sostanza chimica in esame. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonte o fonti coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; e v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Approccio bottom-up: approccio graduale applicato nel caso di una sostanza chimica che si ritiene non richieda di essere classificata in termini di irritazione oculare o gravi lesioni oculari, che inizia con la determinazione delle sostanze chimiche che non richiedono classificazione (esito negativo) rispetto ad altre sostanze chimiche (esito positivo).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Cornea: parte trasparente frontale del bulbo oculare che copre l'iride e la pupilla e consente il passaggio della luce verso l'interno.

Opacità corneale: misurazione del grado di opacità della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza chimica in esame. Un aumento dell'opacità corneale è indice di danni alla cornea. L'opacità può essere valutata in modo soggettivo, come nel test di Draize sugli occhi dei conigli, o oggettivo utilizzando uno strumento come un «opacimetro».

Permeabilità corneale: misurazione quantitativa dei danni all'epitelio corneale, effettuata attraverso la determinazione della quantità di colorante a base di fluoresceina sodica che attraversa tutti gli strati cellulari della cornea.

Irritazione oculare: produzione di alterazioni nell'occhio in seguito all'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, totalmente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione. Sostituibile con "Effetti reversibili sugli occhi" e con la categoria UN GHS 2 (4).

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

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

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

Punteggio di irritazione in vitro (IVIS): formula empirica utilizzata nel metodo di prova BCOP con la quale i valori medi di opacità e permeabilità relativi a ciascun gruppo di trattamento sono combinati per ottenere un unico punteggio in vitro per ogni gruppo di trattamento. $IVIS = \text{valore di opacità medio} + (15 \times \text{valore di permeabilità medio})$

Effetti irreversibili sugli occhi: Cfr. "Gravi lesioni oculari".

Miscela: miscela o soluzione composta da due o più sostanze non reagenti (4).

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

Non classificata: sostanza chimica non classificata in termini di irritazione oculare (categoria UN GHS 2, 2A o 2B) o gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1). Termine intercambiabile con “Senza categoria GHS”.

Opacimetro: strumento impiegato per la misurazione dell'«opacità corneale» attraverso la determinazione della quantità di luce trasmessa attraverso la cornea. Lo strumento tipico ha due compartimenti, ciascuno provvisto di una fonte di luce propria e di una fotocellula. Un comparto è utilizzato per la cornea trattata e l'altro per la taratura e l'azzeramento dello strumento. La luce emessa da una lampada alogena è irradiata attraverso un comparto di controllo (rappresentato da una camera vuota senza finestre o liquidi) a una fotocellula e confrontata con la luce trasmessa a una fotocellula attraverso il comparto di prova in cui si trova la camera contenente la cornea. Si confronta la differenza di luce trasmessa dalle fotocellule e un valore numerico di opacità è visualizzato su un display digitale.

Controllo positivo: una replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che si tratta con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. Il grado dell'irritazione non deve essere eccessivo per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

Effetti reversibili sugli occhi: Cfr. “Irritazione oculare”.

Affidabilità: misura la possibilità di eseguire un metodo di prova in maniera riproducibile nel tempo all'interno dei laboratori e fra di essi seguendo lo stesso protocollo. Si valuta calcolando la riproducibilità intra- e interlaboratorio e la ripetibilità intra-laboratorio.

Gravi lesioni oculari: produzione di danni ai tessuti oculari o indebolimento grave della vista in seguito all'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla parte anteriore dell'occhio, non completamente reversibile entro 21 giorni dall'applicazione. Sostituibile con “Effetti irreversibili sugli occhi” e con “Categoria UN GHS 1” (4).

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

Sostanza: elementi chimici e loro composti allo stato naturale o ottenuti mediante un processo di produzione, compresi gli additivi necessari a conservare la stabilità del prodotto e le impurità derivanti dal processo utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza ripercussioni sulla stabilità della sostanza o modifiche della sua composizione (4).

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

Miscela contenente tensioattivi: nel contesto di questo metodo di prova, si tratta di una miscela contenente uno o più tensioattivi in una concentrazione finale >5 %.

Approccio top-down: approccio graduale applicato nel caso di una sostanza chimica sospettata di indurre gravi lesioni oculari, che inizia con la determinazione delle sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (esito positivo) rispetto ad altre sostanze chimiche (esito negativo).

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

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

Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi standardizzati e livelli di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di precauzioni e schede tecniche di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (4).

Categoria UN GHS 1: cfr. "Gravi lesioni oculari".

Categoria UN GHS 2: cfr. "Irritazione oculare".

Senza categoria UN GHS: sostanze chimiche che non soddisfano i requisiti di classificazione nelle categorie UN GHS 1 o 2 (2A o 2B). Sostituibile con "Non classificata".

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

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

Appendice 2

CAPACITÀ PREDITTIVA DEL METODO DI PROVA BCOP

Tabella 1

Capacità predittiva del metodo BCOP per identificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari [UN GHS/ EU CLP Cat 1 vs Not Cat 1 (Cat 2 + No Cat); US EPA Cat I vs Not Cat I (Cat II + Cat III + Cat IV)]

Sistema di classificazione	N.	Accuratezza		Sensibilità		Falsi negativi		Specificità		Falsi positivi	
		%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.
UN GHS EU CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabella 2

Capacità predittiva del metodo BCOP per identificare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari ("non irritanti") [UN GHS/ EU CLP No Cat vs Not No Cat (Cat 1 + Cat 2); US EPA Cat IV vs Not Cat IV (Cat I + Cat II + Cat III)]

Sistema di classificazione	N.	Accuratezza		Sensibilità		Falsi negativi		Specificità		Falsi positivi	
		%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.
UN GHS EU CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Appendice 3

SOSTANZE CHIMICHE PER LA VERIFICA DELLA COMPETENZA TECNICA NEL METODO DI PROVA BCOP

Prima di utilizzare regolarmente questo metodo di prova, i laboratori dovrebbero dimostrare la loro competenza tecnica identificando correttamente la classificazione del pericolo per gli occhi rappresentato dalle 13 sostanze raccomandate nella tabella 1. Tali sostanze chimiche sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte relative al pericolo per gli occhi in base agli esiti del test in vivo sugli occhi dei conigli (TG 405) (17) e del sistema di classificazione UN GHS (ossia le categorie 1, 2A, 2B, o non classificata) (4). Fra gli altri criteri di selezione si annoverano la disponibilità in commercio, la disponibilità di dati di riferimento in vivo di elevata qualità e la disponibilità di dati di riferimento in vitro di elevata qualità ottenuti con il metodo di prova BCOP. I dati di riferimento sono disponibili nei documenti *Streamlined Summary Document* (3) e *ICCVAM Background Review Document for the BCOP test method* (2)(18).

Tabella 1

Sostanze raccomandate per la verifica della competenza tecnica nel metodo BCOP

Sostanza chimica	CASRN	Classe chimica (1)	Stato fisico	Classificazione (2) in vivo	Classificazione BCOP
Cloruro di benzalconio (5 %)	8001-54-5	Composto ionico	Liquido	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Ammina, ammidina	Solido	Categoria 1	Categoria 1
Acido dibenzoil-L-tartarico	2743-38-6	Acido carbossilico, estere	Solido	Categoria 1	Categoria 1
Imidazolo	288-32-4	Composto eterociclico	Solido	Categoria 1	Categoria 1
Acido tricloroacetico (30 %)	76-03-9	Acido carbossilico	Liquido	Categoria 1	Categoria 1
2,6-Diclorobenzoil-cloruro	4659-45-4	Acil-alogenuro	Liquido	Categoria 2A	Non è possibile fare previsioni accurate/affidabili
Etil-2-metilacetato	609-14-3	Chetone, estere	Liquido	Categoria 2B	Non è possibile fare previsioni accurate/affidabili
Nitrato di ammonio	6484-52-2	Sale inorganico	Solido	Categoria 2 (3)	Non è possibile fare previsioni accurate/affidabili
EDTA, sale dipotassico	25102-12-9	Ammina, acido carbossilico (sale)	Solido	Non classificato	Non classificato
Tween 20	9005-64-5	Estere, polietere	Liquido	Non classificato	Non classificato

Sostanza chimica	CASRN	Classe chimica ⁽¹⁾	Stato fisico	Classificazione ⁽²⁾ in vivo	Classificazione BCOP
2-Mercaptopirimidina	1450-85-7	Acil-alogenuro	Solido	Non classificato	Non classificato
Fenilbutazone	50-33-9	Composto eterociclico	Solido	Non classificato	Non classificato
Poliossietilene 23 lauril etere (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alcool	Liquido	Non classificato	Non classificato

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

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

⁽²⁾ In base ai risultati del test in vivo sugli occhi dei conigli (OCSE TG 405) (17) e sul sistema di classificazione UN GHS (4).

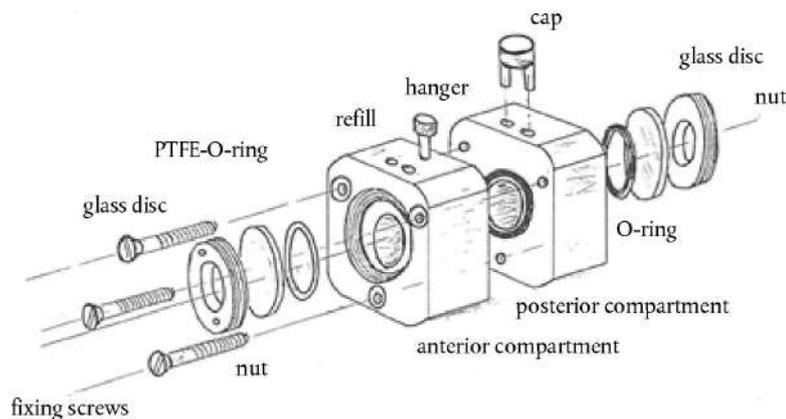
⁽³⁾ La classificazione nelle categorie 2A o 2B dipende dall'interpretazione del criterio UN GHS inteso a distinguere fra queste due categorie, ossia 1 su 3 oppure 2 su 3 animali presentano al giorno 7 gli effetti necessari per determinare una classificazione nella categoria 2A. Lo studio in vivo ha incluso 3 animali. Tutti gli endpoint, tranne il rossore della congiuntiva in un animale, sono regrediti a un punteggio pari a zero entro il giorno 7 o prima. L'unico animale che non aveva recuperato interamente entro il giorno 7 presentava un punteggio di rossore della congiuntiva pari a 1 (al giorno 7), interamente regredito al giorno 10.

Appendice 4

SUPPORTO CORNEALE PER IL METODO DI PROVA BCOP

I supporti corneali impiegati per il test BCOP sono fatti di materiale inerte (per es. polipropilene). I supporti constano di due metà (una camera anteriore e una posteriore) e presentano due camere cilindriche interne simili. Ciascuna camera è progettata per contenere un volume di circa 5 ml e sfocia in una finestra di vetro, attraverso la quale sono registrate le misurazioni dell'opacità. Ciascuna camera interna ha un diametro di 1,7 cm ed è profonda 2,2 cm ⁽¹⁾. Una guarnizione ad anello posta sulla camera posteriore serve a prevenire fuoriuscite. Le cornee sono posizionate dal lato dell'endotelio in basso sulla guarnizione ad anello delle camere posteriori, mentre le camere anteriori sono poste dal lato dell'epitelio delle cornee. Le camere sono mantenute in posizione da tre viti in acciaio inossidabile poste sui bordi esterni della camera. L'estremità di ciascuna camera presenta una finestra in vetro che può essere rimossa per facilitare l'accesso alla cornea. Una guarnizione ad anello è posizionata anche fra la finestra in vetro e la camera per prevenire fuoriuscite. Due aperture nella parte superiore di ciascuna camera consentono di introdurre ed estrarre il mezzo e le sostanze chimiche di prova. Le aperture sono chiuse con tappi di gomma durante le fasi di trattamento e incubazione. La trasmissione della luce attraverso i supporti corneali può modificarsi mano a mano che gli effetti dell'usura o dell'accumulo di specifici residui di materiale sui fori della camera interna o sulla finestra di vetro possono incidere sulla diffusione luminosa o sulla riflettanza. La conseguenza potrebbe constare in aumenti o diminuzioni della trasmissione luminosa di base (e quindi delle letture dell'opacità di base) attraverso i supporti corneali e può essere evidente se intervengono variazioni importanti delle misurazioni dell'opacità corneale iniziale previste nelle camere individuali (ossia i valori iniziali dell'opacità corneale in singoli specifici supporti corneali possono differire di norma di oltre 2 o 3 unità di opacità dai valori di base previsti). Ciascun laboratorio dovrebbe prendere in considerazione l'istituzione di un programma per valutare le modifiche della trasmissione luminosa attraverso i supporti corneali, secondo la natura dei tipi di sostanze chimiche sottoposte a prova e la frequenza di utilizzo delle camere. Per stabilire i valori di base, i supporti corneali possono essere ispezionati prima dell'uso consueto mediante misurazione dei valori di base dell'opacità (o della trasmissione luminosa) delle camere riempite con il mezzo completo, senza cornee. I supporti corneali sono quindi ispezionati con cadenza regolare per accertare le variazioni della trasmissione luminosa durante i periodi di uso. Ciascun laboratorio può stabilire la frequenza di controllo dei supporti corneali, in base ai tipi di chimica sottoposta a prova, alla frequenza d'uso e alle osservazioni delle variazioni dei valori di base dell'opacità corneale. Se si rilevano variazioni importanti della trasmissione luminosa attraverso i supporti corneali, è opportuno prendere in considerazione idonee procedure di pulizia e/o lucidatura della superficie interna dei supporti corneali o la loro sostituzione.

Supporto corneale: diagramma esploso.



⁽¹⁾ Le dimensioni fornite si riferiscono a un supporto corneale utilizzato per bovini di età compresa fra 12 e 60 mesi. Se l'esame è svolto su animali fra i 6 e i 12 mesi di età, il supporto deve essere realizzato in modo tale che ciascuna camera abbia una capacità di 4 ml e che ciascuna camera interna presenti un diametro di 1,5 cm e una profondità di 2,2 cm. Per ogni nuovo supporto corneale è necessario che fra l'area della cornea esposta e il volume della camera posteriore sia mantenuto lo stesso rapporto del supporto corneale tradizionale. Ciò è necessario per garantire la corretta determinazione dei valori di permeabilità per il calcolo del valore IVIS con la formula proposta.

Appendice 5

L'OPACIMETRO

L'opacimetro è un dispositivo di misurazione della luce trasmessa. A titolo di esempio, per l'apparecchiatura OP-KIT di Electro Design (Riom, Francia) usata nella validazione del metodo di prova BCOP, la luce emessa da una lampada alogena è irradiata attraverso un comparto di controllo (una camera vuota senza finestre o liquidi) a una fotocellula e confrontata con la luce trasmessa a una fotocellula attraverso il comparto di prova in cui si trova la camera contenente la cornea. Si confronta la differenza di luce trasmessa dalle fotocellule e un valore numerico di opacità è visualizzato su un display digitale. Le unità di opacità sono predefinite. È possibile usare altri tipi di opacimetri con impostazioni diverse (per es. che non richiedono misurazioni parallele dei compartimenti di controllo e di prova) se è dimostrato che forniscono risultati analoghi a quelli dell'apparecchiatura validata.

L'opacimetro dovrebbe fornire una risposta lineare a partire da una serie di valori di opacità registrati, che coprono tutti i valori limite utilizzati per le diverse classificazioni descritte dal modello predittivo (ovvero, fino al valore limite che determina la presenza di corrosività/irritazione grave). Per garantire letture lineari e accurate fino a 75-80 unità di opacità occorre tarare l'opacimetro attraverso una serie di calibratori. I calibratori sono disposti nella camera di taratura (una camera corneale progettata per contenere i calibratori) e letti sull'opacimetro. La camera di taratura è concepita per alloggiare i calibratori all'incirca alla stessa distanza fra la luce e la fotocellula, alla quale sarebbero poste le cornee durante le misurazioni di opacità. I valori di riferimento e il valore di taratura iniziale dipendono dal tipo di opacimetro impiegato. La linearità delle misurazioni dell'opacità dovrebbero essere garantite da procedure idonee (specifiche dello strumento). A titolo di esempio, per l'apparecchiatura OP-KIT di Electro Design (Riom, Francia) l'opacimetro è inizialmente tarato a 0 unità di opacità per mezzo della camera di taratura senza calibratore. Tre diversi calibratori sono poi disposti all'interno della camera di taratura uno dopo l'altro e i valori di opacità sono successivamente registrati. I calibratori 1, 2 e 3 dovrebbero corrispondere a valori registrati di opacità pari alla rispettiva serie di valori rispettivamente di 75, 150 e 225 unità di opacità, con una tolleranza di $\pm 5\%$.»