

«B.48 Metodo di prova sull'occhio isolato dei polli (*Isolated Chicken Eye* — ICE) 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. 438 (2013). Il metodo di prova sull'occhio isolato dei polli (*Isolated Chicken Eye* — ICE) 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), insieme 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) (3). Nella prima valutazione la validità del metodo di prova ICE è stata riconosciuta come test di screening per identificare le sostanze chimiche (e le miscele) che inducono gravi lesioni oculari (categoria 1) 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) (1) (2) (4) e del regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (CLP) ⁽¹⁾. Nella seconda valutazione il metodo di prova ICE è stato valutato per il suo uso come test di screening per identificare sostanze chimiche non classificate che inducono irritazione oculare o gravi lesioni oculari secondo la definizione del sistema UN GHS (3) (4). I risultati dello studio di validazione e il panel di esame *inter pares* ha ribadito le raccomandazioni originarie di utilizzare il metodo di prova ICE per classificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1) poiché la banca dati disponibile è rimasta invariata dalla validazione originaria dell'ICCVAM. In questa fase non sono state suggerite ulteriori raccomandazioni per un'espansione dell'ambito d'applicazione del metodo di prova ICE al fine di includere altre categorie. È stata condotta una valutazione ulteriore dell'insieme di dati in vitro e in vivo usati nello studio di validazione al fine di valutare l'utilità del metodo di prova ICE per identificare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione

⁽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).

per irritazione oculare o gravi lesioni oculari (5). Questo esercizio ha permesso di concludere che il metodo di prova può inoltre essere usato per identificare le sostanze chimiche che non richiedono una classificazione per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari secondo il sistema UN GHS (4) (5). Questo metodo di prova include gli usi raccomandati e le limitazioni del metodo di prova ICE sulla base di tali valutazioni. Le principali differenze fra la versione originale del 2009 e la versione aggiornata del 2013 della linea guida dell'OCSE comprende fra l'altro l'uso del metodo di prova ICE per identificare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare o gravi lesioni oculari secondo il sistema di classificazione UN GHS, un aggiornamento degli elementi della relazione, un aggiornamento dell'appendice 1 sulle definizioni nonché un aggiornamento dell'appendice 2 sulle sostanze chimiche di riferimento.

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 (6). L'approccio top-down (7) è usato quando, in base alle informazioni esistenti, si stima che una sostanza chimica abbia un elevato potenziale di irritazione, mentre l'approccio bottom-up (7) è usato quando, in base alle informazioni esistenti, si stima che una sostanza chimica non causi un'irritazione oculare sufficiente da richiedere una classificazione. Il metodo di prova ICE è un metodo di prova in vitro che può essere usato in alcune circostanze e con limitazioni specifiche, come descritto ai paragrafi da 8 a 10, 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 ICE è raccomandato come fase iniziale nell'ambito di una strategia di prova, quale l'approccio top-down proposto da Scott *et al.* (7) 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 ICE è altresì raccomandato per identificare le sostanze chimiche che non richiedono una classificazione per l'irritazione oculare o per gravi lesioni oculari, secondo la definizione del sistema GHS delle Nazioni Unite ("senza categoria") (4) e può quindi essere usato come fase iniziale nell'ambito di una strategia di prova quale l'approccio bottom-up (7). 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). Si dovrebbero inoltre consultare le autorità di regolamentazione preposte prima di utilizzare il metodo di prova ICE in un approccio bottom-up nell'ambito di sistemi di classificazione diversi dal sistema UN GHS.

Scopo di questo metodo di prova è descrivere le procedure impiegate per valutare il potenziale di rischio oculare di una sostanza chimica in esame sulla base della capacità di tale sostanza di causare tossicità in un occhio enucleato di pollo. Gli effetti tossici sulla cornea sono misurati attraverso i) una valutazione qualitativa dell'opacità, ii) una valutazione qualitativa dei danni all'epitelio in base all'applicazione di fluoresceina all'occhio (ritenzione della fluoresceina), iii) una misurazione quantitativa dell'aumento dello spessore (rigonfiamento), e iv) una stima qualitativa di eventuali danni morfologici macroscopici alla superficie. L'opacità, il rigonfiamento e le stime dei danni della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza chimica in esame sono valutati individualmente e poi cumulativamente per formulare un sistema di classificazione di irritazione oculare (*Eye Irritancy Classification*).

Le definizioni figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

Il presente metodo di prova ICE si basa sul protocollo suggerito nel documento orientativo n. 160 dell'OCSE (8), elaborato in seguito allo studio internazionale di validazione dell'ICCVAM (1) (3) (9) con il contributo dell'ECVAM e del JaCVAM nonché del dipartimento di tossicologia e farmacologia applicata per la qualità della vita (TNO, Paesi Bassi). Il protocollo si basa su informazioni ottenute da protocolli già pubblicati, nonché dal protocollo attualmente impiegato dal TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Nella validazione del metodo in questione è stato sottoposto a prova un'ampia gamma di sostanze chimiche e la banca dati empirica dello studio di validazione comprende 152 sostanze chimiche, fra cui 72 sostanze e 80 miscele (5). Questo metodo di prova è applicabile ai solidi, ai liquidi, alle emulsioni e ai gel. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi; i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. I gas e gli aerosol non sono ancora stati valutati nell'ambito di uno studio di validazione.

Il metodo di prova ICE può essere usato per classificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari, ossia le sostanze chimiche da classificare nella categoria UN GHS 1 (4). Quando è usato a questo fine, le limitazioni identificate per il metodo di prova ICE sono basate su un tasso elevato di falsi positivi per gli alcoli e un elevato tasso di falsi negativi per i solidi e i tensioattivi (1) (3) (9). La percentuale di falsi negativi ottenuta (categoria UN GHS 1) in questo contesto non costituisce un aspetto critico poiché tutte le sostanze chimiche in esame che producono un risultato negativo sono 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. È opportuno osservare che i solidi possono generare condizioni di esposizione variabili ed estreme nel test di Draize in vivo, che potrebbe falsare il reale potenziale di irritazione (15). Gli sperimentatori potrebbero prendere in considerazione il ricorso a tale metodo per tutti i tipi di sostanze chimiche, laddove un risultato positivo dovrebbe essere accettato come indicativo di una risposta che induce gravi lesioni oculari, per es. classificazione nella categoria UN GHS 1, senza ulteriori prove. I risultati positivi ottenuti con gli alcoli andrebbero tuttavia interpretati con cautela, considerato il rischio di effettuare previsioni non corrette.

Se usato per identificare le sostanze chimiche che inducono gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1), il metodo di prova ICE presenta un'accuratezza dell'86 % (120/140), una percentuale di falsi positivi del 6 % (7/113) e una percentuale di falsi negativi del 48 % (13/27), rispetto ai dati ottenuti con il test in vivo sugli occhi dei conigli classificati secondo il sistema di classificazione UN GHS (4) (5).

Il metodo di prova ICE 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). Si dovrebbero consultare le autorità di regolamentazione preposte prima di utilizzare il metodo di prova ICE in un approccio bottom-up nell'ambito di sistemi di classificazione diversi. Questo metodo di prova può essere usato per tutti i tipi di sostanze chimiche in cui è accettabile un risultato negativo per non classificare una sostanza chimica per irritazione oculare o gravi lesioni oculari. Tuttavia, sulla base di un unico risultato proveniente dalla banca dati di validazione le pitture antivegetative contenenti solventi organici possono essere sottostimate (5).

Se usato per identificare le sostanze chimiche che non richiedono classificazione per irritazione oculare e gravi lesioni oculari, il metodo di prova ICE presenta un'accuratezza dell'82 % (125/152), una percentuale di falsi positivi del 33 % (26/79) e una percentuale di falsi negativi dell'1 % (1/73), rispetto ai dati ottenuti con il test in vivo sugli occhi dei conigli classificati secondo il sistema di classificazione UN GHS (4) (5). Se le sostanze chimiche in esame nell'ambito di alcune classi chimiche (per es. pitture antivegetative contenenti solventi organici) sono escluse dalla banca dati, il metodo di prova ICE presenta un'accuratezza complessiva dell'83 % (123/149), una percentuale di falsi positivi del 33 % (26/78) e una percentuale di falsi negativi dello 0 % (0/71) secondo il sistema di classificazione UN GHS (5).

Il metodo di prova ICE 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 le sostanze chimiche "senza categoria" secondo il sistema UN GHS sovraclassificate nelle categorie 2, 2A o 2B. A tal fine possono essere necessarie ulteriori prove con un altro metodo adeguato.

Tutte le procedure che prevedono l'impiego di occhi di polli dovrebbero osservare le regole e le procedure in vigore nella struttura che effettua l'analisi relativamente alla gestione di materiali di derivazione umana o animale che comprendono, tra l'altro, i tessuti e i liquidi tessutali. È consigliabile adottare le comuni norme di cautela osservate nei laboratori (16).

Sebbene il metodo di prova ICE non prenda in considerazione le lesioni della congiuntiva e dell'iride valutati secondo il metodo di prova per l'irritazione oculare sui conigli, esso riguarda gli effetti sulla cornea, che sono i principali fattori di classificazione in vivo secondo la classificazione UN GHS. Inoltre, benché il metodo di prova ICE non consente di per sé 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 (17). In particolare 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 ICE non consente di valutare il potenziale di tossicità sistemica associato all'esposizione attraverso l'occhio.

Infine, questo metodo di prova 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. 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. L'OCSE ha elaborato un documento orientativo sull'uso dei metodi di prova in vitro per la tossicità oculare, che comprende procedure dettagliate sulla raccolta di campioni istopatologici e informazioni in merito alla trasmissione di campioni e/o di dati istopatologici (8).

Ai laboratori che ricorrono a questo tipo di metodo di prova per la prima volta si consiglia di utilizzare le sostanze chimiche di riferimento per la verifica della competenza tecnica indicate nell'appendice 2. Un laboratorio può utilizzare tali sostanze chimiche per dimostrare le proprie competenze tecniche nell'esecuzione del metodo di prova ICE prima di presentare i dati relativi al metodo di prova ICE a scopi regolamentari per la classificazione dei rischi.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Il metodo di prova ICE è un modello organotipico per il mantenimento di occhi di pollo a breve termine in vitro. Questo metodo di prova consente di valutare i danni prodotti dalla sostanza chimica in esame in base al rigonfiamento corneale, all'opacità e alla ritenzione di fluoresceina. Mentre gli ultimi due parametri richiedono una valutazione qualitativa, l'analisi del rigonfiamento corneale è di tipo quantitativo. Ciascuna misurazione è convertita in un punteggio quantitativo usato per calcolare un indice di irritazione generale oppure è categorizzata qualitativamente al fine di assegnare un pericolo oculare in vitro, alla categoria UN GHS 1 o senza categoria UN GHS. Questi risultati possono essere quindi usati per stimare in vivo il potenziale di gravi lesioni oculari o dell'assenza di classificazione relativamente alla classificazione di pericolo oculare di una sostanza chimica (cfr. criteri decisionali). Con il metodo di prova ICE non è tuttavia possibile attribuire una classificazione delle sostanze non ritenute causare gravi lesioni oculari o non classificate (cfr. paragrafo 11).

Origine ed età degli occhi dei polli

Storicamente, per questo tipo di saggio sono utilizzati occhi prelevati da polli abbattuti nei mattatoi per il consumo alimentare umano, ovviando in questo modo alla necessità di utilizzare animali da laboratorio. Sono impiegati solamente occhi di animali sani ritenuti idonei a essere immessi nella catena alimentare umana.

Sebbene non sia stato condotto alcuno studio con controlli per identificare l'età ottimale del pollo, l'età e il peso degli animali storicamente impiegati per questo metodo di prova corrispondono a quelli dei pollastri tradizionalmente abbattuti nei macelli per pollame (ovvero, pollastri di circa 7 settimane e 1,5 – 2,5 kg di peso).

Prelievo e trasporto degli occhi in laboratorio

Si suggerisce di rimuovere le teste subito dopo aver stordito i polli, di norma con scossa elettrica, e aver praticato loro un'incisione sul collo per consentire il sanguinamento. È preferibile che l'allevamento da cui provengono i polli sia situato nelle vicinanze del laboratorio, per consentire di trasferire le teste dal macello in tempi sufficientemente rapidi e ridurre così al minimo il deterioramento e/o la contaminazione batterica. L'intervallo temporale fra la raccolta delle teste di pollo e la collocazione degli occhi nella camera di superfusione in seguito all'enucleazione dovrebbe essere minimizzato (di norma, entro due ore) per garantire il rispetto dei criteri di accettazione del saggio. Si suggerisce di utilizzare per il saggio occhi dello stesso gruppo di prelievo, ottenuti nella medesima giornata.

Gli occhi sono dissezionati in laboratorio, pertanto il trasporto delle teste intatte dal macello deve avvenire a temperatura ambiente (solitamente 18°-25°) in scatole di plastica umidificate con panni inumiditi di soluzione salina isotonica.

Criteri di selezione e numero di occhi usati nel metodo di prova ICE

Sono scartati gli occhi che presentano consistenti macchie di fluoresceina ($> 0,5$) o un punteggio di opacità corneale elevato ($> 0,5$) dopo l'enucleazione.

Ciascun gruppo di trattamento e di controllo positivo parallelo comprende almeno tre occhi. Il gruppo di controllo negativo o del solvente (se si utilizza un solvente diverso dalla soluzione salina) comprende almeno un occhio.

Nel caso dei materiali solidi che producono un risultato UN GHS, si raccomanda un secondo ciclo di tre occhi per confermare o smentire il risultato negativo.

PROCEDURA

Preparazione degli occhi

Le palpebre sono asportate con cautela, facendo attenzione a non danneggiare la cornea. L'integrità della cornea è subito valutata con una goccia di fluoresceina sodica al 2 % (p/v) applicata alla superficie della cornea per alcuni secondi e poi risciacquata con soluzione salina isotonica. Gli occhi trattati con la fluoresceina sono poi esaminati al microscopio con lampada a fessura per assicurare che la cornea non presenti danni (per es. ritenzione di fluoresceina e valori di opacità corneale $\leq 0,5$).

Se non è danneggiato, l'occhio è ulteriormente dissezionato dal cranio facendo attenzione a non danneggiare la cornea. Il bulbo oculare è estratto dall'orbita servendosi di pinze chirurgiche per tenere saldamente ferma la membrana nittitante e i muscoli oculari sono tagliati con forbici chirurgiche curve smusse. È importante non applicare una pressione eccessiva (per es. artefatti da compressione) per evitare di danneggiare la cornea.

Nel rimuovere l'occhio dall'orbita, dovrebbe restare attaccata una porzione visibile di nervo ottico. Rimosso dall'orbita, l'occhio è posto su un tappetino assorbente e sono recisi la membrana nittitante e il restante tessuto connettivo.

L'occhio enucleato è montato in un morsetto in acciaio inossidabile con la cornea in posizione verticale. Il morsetto è poi trasferito all'interno di una camera dell'apparecchio di superfusione (18). I morsetti dovrebbero essere posizionati nell'apparecchio di superfusione in modo che tutta la cornea sia esposta alla perfusione di soluzione salina isotonica (3-4 gocce al minuto o 0,1-0,15 ml/min). Le camere dell'apparecchio di superfusione devono essere a temperatura controllata di 32 ($\pm 1,5$) °C. L'appendice 3 presenta un diagramma esemplificativo di apparecchio di superfusione e dei morsetti oculari, che sono disponibili sul mercato o possono essere costruiti. L'apparecchio può essere modificato a seconda delle esigenze dei singoli laboratori (per es. per alloggiare un numero diverso di occhi).

Dopo l'inserimento nell'apparecchio di superfusione, gli occhi sono nuovamente esaminati con un microscopio con lampada a fessura per accertarsi che non siano stati danneggiati durante la procedura di dissezione. È opportuno misurare anche lo spessore corneale, questa volta all'apice della cornea, utilizzando lo strumento di misurazione della profondità del microscopio con lampada a fessura. Occhi con i), un punteggio di ritenzione della fluoresceina $> 0,5$; ii) opacità corneale $> 0,5$; o iii) qualsiasi altro segno di lesione, dovrebbero essere sostituiti. Fra gli occhi che non sono stati scartati per nessuno dei criteri suddetti, devono essere scartati gli occhi con una deviazione dello spessore corneale di oltre il 10 % dal valore medio di tutti gli occhi. È opportuno che gli sperimentatori siano consapevoli del fatto che i microscopi con lampade a fessura possono produrre misurazioni dello spessore corneale diverse a seconda delle diverse larghezze su cui è impostata la fessura. La larghezza della fessura dovrebbe essere impostata a 0,095 mm.

Dopo essere stati esaminati e selezionati, gli occhi sono incubati per un periodo di tempo compreso fra 45 e 60 minuti circa per l'equilibratura con il sistema prima del dosaggio. Successivamente al periodo di equilibratura è registrato il valore di riferimento per lo spessore e l'opacità della cornea, che funge da base per le altre misurazioni (per es. tempo = 0). Il valore di fluoresceina determinato al momento della dissezione è usato come misurazione di base per questo risultato.

Applicazione della sostanza chimica in esame

Subito dopo le misurazioni del valore di riferimento (zero) si estrae l'occhio (nel suo supporto) dall'apparecchio di superfusione, lo si dispone in posizione orizzontale e si applica alla cornea la sostanza chimica in esame.

Le sostanze chimiche in esame liquide sono di norma analizzate non diluite, ma possono essere diluite se lo si ritiene necessario (per es. se previsto dallo studio). Il solvente più frequentemente utilizzato per le sostanze chimiche in esame diluite è la soluzione salina fisiologica. In determinate condizioni controllate possono tuttavia essere utilizzati anche solventi alternativi diversi dalla soluzione salina fisiologica, ma la loro idoneità deve essere comunque dimostrata.

Le sostanze chimiche in esame liquide sono applicate alla cornea in modo che l'intera superficie sia uniformemente coperta con tale sostanza; il volume standard è pari a 0,03 ml.

Se possibile, è opportuno tritare le sostanze chimiche in esame solide il più finemente possibile in un mortaio con un pestello o un analogo strumento di macinatura. La polvere è applicata alla cornea in modo che la superficie sia uniformemente coperta con tale sostanza; il quantitativo standard è pari a 0,03 g.

La sostanza chimica in esame (liquida o solida) è applicata per 10 secondi e successivamente risciacquata dall'occhio con circa 20 ml di soluzione salina isotonica a temperatura ambiente. L'occhio (nel suo supporto) è in seguito posizionato nuovamente nell'apparecchio di superfusione nella posizione verticale originaria. Se necessario, è possibile risciacquare ulteriormente dopo l'applicazione di 10 secondi e a scadenze temporali successive (per es. se sono presenti residui di sostanza chimica in esame sulla cornea). Di norma il quantitativo di soluzione salina usato in aggiunta per il risciacquo non è rilevante, tuttavia l'osservazione dell'adesione della sostanza chimica alla cornea è importante.

Sostanze chimiche di controllo

Ogni saggio dovrà comprendere controlli negativi o con solventi/mezzi disperdenti e controlli positivi paralleli.

Le prove con i liquidi al 100 % o i solidi prevedono l'impiego di una soluzione salina fisiologica come controllo negativo parallelo nel metodo di prova ICE per rilevare cambiamenti non specifici del sistema di prova e assicurare che le condizioni sperimentali non causino una reazione irritante non desiderata.

Le prove con i liquidi diluiti comprendono un gruppo di controllo con solventi/mezzi disperdenti per rilevare cambiamenti non specifici del sistema di prova e assicurare che le condizioni sperimentali non causino una reazione irritante non desiderata. Come indicato al paragrafo 31, può essere utilizzato solo un solvente/mezzo disperdente per il quale si sia dimostrato che non ha ripercussioni negative sul sistema di prova.

Ciascuna prova comprende un controllo positivo parallelo (noto irritante per occhi) per verificare la possibilità di indurre una reazione adeguata. Poiché il presente metodo di prova utilizza il saggio ICE per l'identificazione di sostanze corrosive o gravemente irritanti, il controllo positivo ideale dovrebbe essere una sostanza chimica di riferimento che consenta di indurre una reazione grave durante questo metodo di prova. Tuttavia la portata dell'irritazione non dovrebbe essere eccessiva per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo. Dovrebbero essere generati dati in vitro sufficienti per il controllo positivo in modo da poter calcolare una serie statisticamente accettabile di dati per il controllo positivo. Se non sono disponibili dati storici idonei relativi al metodo di prova ICE per un determinato controllo positivo, è opportuno condurre degli studi per ottenere questo tipo di informazioni.

L'acido acetico al 10 % o il cloruro di benزالconio al 5 % sono esempi di controlli positivi di sostanze chimiche in esame liquide, mentre esempi di controlli positivi per le sostanze di prova solide comprendono l'idrossido di sodio o l'imidazolo.

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

Endpoint misurati

La valutazione delle cornee trattate avviene prima del trattamento e dopo 30, 75, 120, 180 e 240 minuti (con una tolleranza di ± 5 minuti) dal risciacquo successivo al trattamento. Queste scadenze temporali consentono di svolgere un numero idoneo di misurazioni nel corso del periodo complessivo di quattro ore previsto dal trattamento e lasciano al tempo stesso un periodo sufficiente fra una misurazione e l'altra per le necessarie osservazioni da effettuarsi su tutti gli occhi.

Gli endpoint valutati sulla cornea comprendono fenomeni quali opacità e rigonfiamento corneali, ritenzione di fluoresceina ed effetti morfologici (per es. *pitting* o allentamento dell'epitelio). Tutti gli endpoint sono rilevati a ciascuna delle scadenze temporali sopra menzionate, ad eccezione della ritenzione della fluoresceina che è determinata solo prima del trattamento e 30 minuti dopo l'esposizione alla sostanza chimica in esame.

È consigliabile servirsi di fotografie per documentare l'opacità corneale, la ritenzione della fluoresceina, gli effetti morfologici e l'istopatologia, se effettuata.

Dopo l'esame finale condotto al termine delle quattro ore, si suggerisce agli sperimentatori di conservare gli occhi in un apposito fissativo (per es. formalina tamponata neutra) per un possibile esame istopatologico (cfr. paragrafo 14 e riferimento 8 per i dettagli).

Il rigonfiamento corneale si determina grazie a misurazioni dello spessore della cornea, condotte con un pachimetro ottico montato su un microscopio con lampada a fessura. Il valore relativo è espresso in percentuale ed è calcolato sulla base delle misurazioni dello spessore della cornea secondo la seguente formula:

$$\left(\frac{\text{spessore della cornea al tempo } t - \text{spessore della cornea al tempo } = 0}{\text{spessore della cornea al tempo } = 0} \right) \times 100$$

La percentuale media di rigonfiamento corneale per tutti gli occhi sottoposti al saggio è calcolata a tutte le scadenze temporali di osservazione. In base al punteggio medio più elevato di rigonfiamento corneale, osservato a ciascuna scadenza, è poi assegnato un punteggio complessivo di categoria per ciascuna sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 51).

L'opacità corneale è valutata usando l'area della cornea maggiormente opacizzata per stabilire un punteggio secondo la tabella 1. La percentuale media di opacità corneale per tutti gli occhi sottoposti al saggio è calcolata a tutte le scadenze temporali di osservazione. In base al punteggio medio più elevato di opacità corneale, osservato a ciascuna scadenza, è poi assegnato un punteggio complessivo di categoria per ciascuna sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 51).

Tabella 1

Punteggi di opacità corneale

Punteggio	Osservazione
0	Nessuna opacità
0,5	Opacità molto lieve
1	Opacità distribuita o diffusa in varie zone; dettagli dell'iride chiaramente visibili
2	Area traslucida facilmente visibile; dettagli dell'iride leggermente oscurati
3	Grave opacità corneale; nessun dettaglio specifico dell'iride visibile; dimensioni della pupilla appena discernibili
4	Opacità corneale completa; iride invisibile

Il valore di ritenzione della fluoresceina è valutato solo a 30 minuti, come indicato alla tabella 2. Il valore di ritenzione della fluoresceina medio per tutti gli occhi esaminato è calcolato a 30 minuti dal trattamento e vale come punteggio di categoria assegnato a ciascuna sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 51).

Tabella 2

Punteggi di ritenzione della fluoresceina

Punteggio	Osservazione
0	Nessuna ritenzione della fluoresceina
0,5	Lievi macchie nelle singole cellule
1	Macchie nelle singole cellule diffuse in tutta l'area trattata della cornea
2	Macchie focalizzate o addensate e confluenti delle singole cellule
3	Vaste aree confluenti della cornea con ritenzione di fluoresceina

Gli effetti morfologici comprendono il "pitting" delle cellule epiteliali corneali, l'"allentamento" dell'epitelio, l'"irruvidimento" della superficie corneale e l'"incollamento" della sostanza chimica in esame alla cornea. Questi risultati possono variare in termini di gravità e presentarsi contemporaneamente. La classificazione dei risultati suddetti è soggettiva e dipende dall'interpretazione del ricercatore.

DATI E RELAZIONE

Valutazione dei dati

I risultati delle misurazioni relative a opacità e rigonfiamento corneali e ritenzione di fluoresceina dovrebbero essere valutati separatamente per creare una classe ICE per ciascun endpoint. Le classi ICE relative a ciascun endpoint sono poi associate per generare una classificazione di irritazione per ciascuna sostanza chimica in esame.

Criteri decisionali

Dopo aver valutato ciascun endpoint, è possibile assegnare le classi ICE sulla base di una serie predefinita. L'interpretazione del rigonfiamento corneale (tabella 3), dell'opacità (tabella 4) e della ritenzione della fluoresceina (tabella 5), utilizzando quattro classi ICE, avviene in base alle seguenti scale di classificazione: è importante osservare che i punteggi di rigonfiamento corneale di cui nella tabella 3 sono applicabili solo se lo spessore è misurato con microscopio con lampada a fessura (per es. del tipo Haag-Streit BP900) con dispositivo di misurazione della profondità n. 1 e larghezza della fessura impostata a 9/2, pari a 0,095 mm. È opportuno richiamare l'attenzione degli sperimentatori sul fatto che i microscopi con lampade a fessura possono produrre misurazioni dello spessore della cornea diverse a seconda delle diverse larghezze su cui è impostata la fessura.

Tabella 3

Criteri di classificazione ICE per il rigonfiamento corneale

Rigonfiamento corneale medio (%) (*)	Classe ICE
0-5	I
> 5-12	II

Rigonfiamento corneale medio (%) (*)	Classe ICE
> 12-18 (> 75 minuti dopo il trattamento)	II
> 12-18 (\leq 75 minuti dopo il trattamento)	III
> 18-26	III
> 26-32 (> 75 minuti dopo il trattamento)	III
> 26-32 (\leq 75 minuti dopo il trattamento)	IV
> 32	IV

(*) Massimo punteggio medio osservato a qualsiasi scadenza temporale

Tabella 4

Criteria di classificazione ICE per l'opacità

Punteggio medio di opacità massima (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Massimo punteggio medio osservato a qualsiasi scadenza temporale (basato sui punteggi di opacità definiti nella tabella 1).

Tabella 5

Criteria di classificazione ICE per la ritenzione media di fluoresceina

Punteggio medio di ritenzione della fluoresceina a 30 minuti dopo il trattamento (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) In base ai punteggi definiti nella tabella 2.

La classificazione in vitro di una sostanza chimica è valutata mediante lettura della classificazione UN GHS corrispondente alla combinazione di categorie risultanti per il rigonfiamento corneale, l'opacità e la ritenzione della fluoresceina secondo la tabella 6.

Tabella 6

Classificazioni in vitro generali.

Classificazione UN GHS	Combinazione dei 3 endpoint
Nessuna categoria	3 × I 2 × I, 1 × II
Non è possibile fare previsioni	Altre combinazioni
Categoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacità corneale ≥ 3 a 30 minuti (in almeno 2 occhi) Opacità corneale = 4 a ogni scadenza di rilevazione (in almeno 2 occhi) Grave allentamento dell'epitelio (in almeno 1 occhio)

(*) Combinazioni meno probabili.

Criteri di accettazione dello studio

Una prova è ritenuta accettabile se i controlli negativi o con solventi/mezzi disperdenti e i controlli positivi paralleli sono identificati rispettivamente come “senza categoria e di categoria UN GHS 1”.

Relazione di prova

La relazione di prova dovrebbe includere 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;
- numero di registro CAS (RN), se conosciuto;
- purezza e composizione delle sostanze chimiche in esame/controllo (in percentuale ponderale), nella misura in cui l'informazione è disponibile;
- proprietà fisico-chimiche pertinenti per la realizzazione dello studio, quali la natura fisica, la volatilità, il pH, la stabilità, la classe chimica e la solubilità in acqua;
- trattamento delle sostanze chimiche in esame/controllo prima del test, se del caso (per es. riscaldamento, frantumazione);
- stabilità, se conosciuta;

Informazioni relative allo sponsor e al laboratorio sperimentale

- Nome e indirizzo dello sponsor, del laboratorio sperimentale e del responsabile dello studio;
- identificazione dell'origine degli occhi (ovvero, la struttura presso la quale sono stati prelevati);

Condizioni del metodo di prova

- Descrizione del sistema di prova utilizzato;

- microscopio con lampada a fessura usato (per es. modello) e impostazioni relative al microscopio con lampada a fessura utilizzata;
- riferimento ai risultati storici dei controlli negativi e positivi e, se pertinente, dati storici a dimostrazione dell'accettabilità della serie di controlli di riferimento paralleli.
- 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).

Prelievo e preparazione degli occhi

- Età e peso dell'animale donatore e, se disponibili, altre caratteristiche specifiche degli animali da cui sono stati prelevati gli occhi (per es. sesso, razza);
- condizioni di conservazione e trasporto degli occhi (per es. data e ora della raccolta degli occhi, intervallo temporale fra la raccolta delle teste di pollo e la collocazione degli occhi enucleati nella camera di superfusione);
- preparazione e montaggio delle cornee comprese le dichiarazioni relative alla loro qualità, temperatura delle camere corneali e criteri per la selezione delle cornee usate nella prova.

Procedura di prova

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

Risultati

- Tabulazione dei punteggi di rigonfiamento corneale, opacità e ritenzione della fluoresceina, ottenuti per ciascun occhio e a ciascuna scadenza temporale, compresi i punteggi medi a ciascuna scadenza temporale di osservazione di tutti gli occhi sottoposti a prova;
- i punteggi medi più elevati di rigonfiamento corneale, opacità e ritenzione della fluoresceina osservati (in qualsiasi scadenza temporale) e la pertinente classe ICE;
- descrizione di qualunque altro effetto osservato,
- classificazione secondo il sistema UN GHS derivata in vitro;
- se del caso, fotografie dell'occhio.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

- (1) ICCVAM (2007). 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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (2) ESAC (2007). Dichiarazione sulla conclusione dello studio retrospettivo dell'ICCVAM sui saggi organotipici in vitro come test di screening per identificare le potenziali sostanze corrosive per l'occhio e i gravi irritanti oculari. Available at: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.

- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of in vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre 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>.
 - (4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
 - (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.
 - (6) Capitolo B.5 del presente allegato, Irritazione/corrosione oculare acuta.
 - (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
 - (8) OECD (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, OECD, Paris.
 - (9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.
 - (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
 - (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 - (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
 - (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
 - (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
 - (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
 - (16) 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/isolation2007.pdf>.
 - (17) 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.
 - (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The in vitro assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
-

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 note, 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 in esame. Un aumento dell'opacità corneale è indice di danni alla cornea.

Rigonfiamento corneale: misurazione oggettiva nel metodo di prova ICE del grado di distensione della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza chimica in esame. Si esprime in percentuale ed è calcolato a partire dalle misurazioni di riferimento (pre-dosaggio) dello spessore corneale e dallo spessore registrato a intervalli regolari dopo l'esposizione alla sostanza chimica di prova del metodo di prova ICE. Il grado di rigonfiamento corneale è indice di danni alla 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.

Ritenzione della fluoresceina: misurazione soggettiva nel metodo di prova ICE consiste nel quantitativo di fluoresceina sodica ritenuto nelle cellule epiteliali della cornea in seguito all'esposizione a una sostanza chimica in esame. Il grado di ritenzione della fluoresceina è indicativo della lesione dell'epitelio corneale.

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.

Effetti irreversibili sugli occhi: cfr. "Gravi lesioni oculari" e "Categoria UN GHS 1".

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) o gravi lesioni oculari (categoria UN GHS 1). Termine intercambiabile con “Senza categoria GHS”.

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. La gravità della reazione non deve essere eccessiva, per garantire la possibilità di valutare la variabilità della reazione dei controlli positivi nel tempo.

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. Si valuta calcolando la riproducibilità intra- e inter-laboratorio e la ripetibilità intra-laboratorio.

Effetti irreversibili sugli occhi: cfr. “Irritazione oculare” e “Categoria UN GHS 2”.

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).

Microscopio con lampada a fessura: strumento utilizzato per esaminare direttamente l'occhio sotto l'ingrandimento di un microscopio binoculare e creando un'immagine stereoscopica e dritta. Nel metodo di prova ICE lo strumento è usato per esaminare le strutture anteriori degli occhi dei polli nonché misurare oggettivamente lo spessore della cornea mediante un apposito accessorio.

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 i campioni trattati 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.

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 globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (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 informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (4).

Categoria UN GHS 1: cfr. “Gravi lesioni oculari” e/o “Effetti irreversibili sugli occhi”.

Categoria UN GHS 2: cfr. “Irritazione oculare” e/o “Effetti reversibili sugli occhi”.

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.

Appendice 2

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

Prima di utilizzare regolarmente un metodo di prova che soddisfi i requisiti delle presenti linee guida, i laboratori dovrebbero dimostrare la loro competenza tecnica identificando correttamente la classificazione di corrosività oculare delle 13 sostanze raccomandate nella tabella 1. Tali sostanze chimiche sono state selezionate per rappresentare la gamma di risposte relative ai pericoli per gli occhi in base agli esiti del test in vivo sugli occhi dei conigli (TG 405) (17) e al sistema di classificazione UN GHS (ossia le categorie 1, 2A, 2B, o "senza categoria") (4) (6). Fra gli altri criteri di selezione si annoverano la disponibilità in commercio delle sostanze chimiche, 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 ICE. I dati di riferimento sono disponibili nei documenti *Streamlined Summary Document* (5) e *ICCVAM Background Review Document for the ICE test method* (9).

Tabella 1:

ostanze chimiche raccomandate per la verifica della competenza tecnica nel metodo ICE

Sostanza chimica	CASRN	Classe chimica (1)	Stato fisico	Classificazione (2) in vivo	Classificazione (3) in vitro
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 (4)
Nitrato di ammonio	6484-52-2	Sale inorganico	Solido	Categoria 2A (5)	Non è possibile fare previsioni (4)
Etil 2-metilacetato	609-14-3	Chetone, estere	Liquido	Categoria 2B	Non è possibile fare previsioni (4)
Solfossido di dimetile	67-68-5	Composto inorganico dello zolfo	Liquido	Nessuna categoria	Nessuna categoria
Glicerolo	56-81-5	Alcol	Liquido	Nessuna categoria	Senza categoria (al limite)

Sostanza chimica	CASRN	Classe chimica ⁽¹⁾	Stato fisico	Classificazione ⁽²⁾ in vivo	Classificazione ⁽³⁾ in vitro
Metilciclopentano	96-37-7	Idrocarburo (ciclico)	Liquido	Nessuna categoria	Nessuna categoria
n-esano	110-54-3	Idrocarburi (aciclico)	Liquido	Nessuna categoria	Nessuna categoria
Triacetina	102-76-1	Lipidi	Liquido	Non classificato	Nessuna categoria

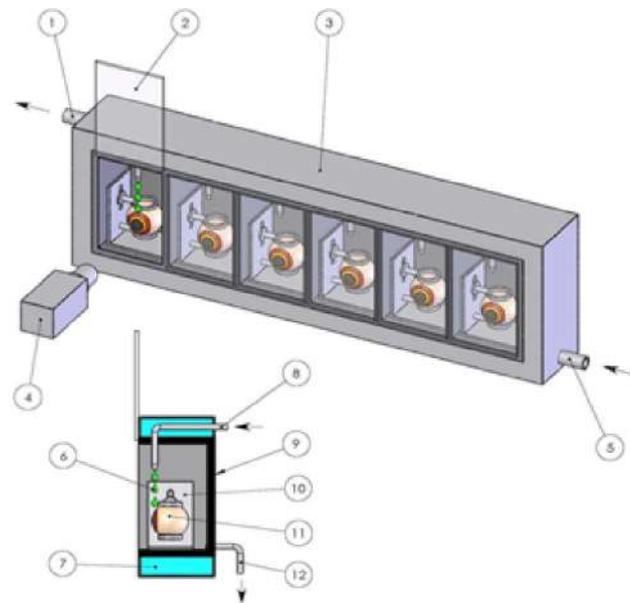
Abbreviazioni: CASRN = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*)

- (¹) Ciascuna sostanza di prova 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 <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).
- (²) Basata sui risultati del test sugli occhi dei conigli in vivo (OECD TG 405) e sul sistema di classificazione UN GHS (4)(6).
- (³) In base ai risultati ICE descritti nella tabella 6.
- (⁴) Combinazione dei punteggi ICE diversi da quelli descritti nella tabella 6 per identificare l'assenza di categoria o la categoria 1 del sistema UN GHS (cfr. tabella 6)
- (⁵) 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.

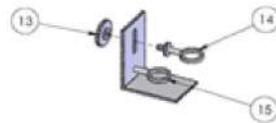
Appendice 3

DIAGRAMMI RELATIVI ALL'APPARECCHIO ICE DI SUPERFUSIONE E AI MORSETTI OCULARI

(cfr Burton et al. (18) per ulteriori descrizioni generiche dell'apparecchio di superfusione e del morsetto oculare)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Voce n.	Descrizione	Voce n.	Descrizione
1	Uscita acqua calda	9	Comparto
2	Sportello scorrevole	10	Supporto corneale
3	Apparecchio di superfusione	11	Occhio di pollo
4	Strumento di misurazione ottica	12	Uscita soluzione salina
5	Ingresso acqua calda	13	Vite di fissaggio
6	Soluzione salina	14	Braccio superiore regolabile
7	Acqua calda	15	Braccio inferiore fisso»
8	Ingresso soluzione salina		