

## INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 405 (2012). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono rivedute periodicamente affinché riflettano le migliori conoscenze scientifiche disponibili. Nelle precedenti revisioni di questa linea guida si è prestata particolare attenzione, mediante la valutazione di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, ai miglioramenti che si possono apportare per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio e tenere conto in modo più adeguato del benessere degli animali. La linea guida n. 405 (adottata nel 1981 e aggiornata nel 1987, 2002 e 2012) raccomanda, prima di eseguire il saggio in vivo descritto per l'irritazione/corrosione oculare acuta, di effettuare un'analisi basata sul "peso dell'evidenza" (*weight-of-the-evidence*) (1) dei dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di ottenerli mediante l'applicazione di sperimentazioni sequenziali (2)(3). La strategia sperimentale raccomandata comprende l'esecuzione di prove in vitro validate ed accettate ed è descritta nell'allegato del presente metodo. Ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (1), una strategia sperimentale integrata è inclusa anche nella rispettiva linea guida ECHA (21). La sperimentazione sugli animali dovrebbe essere effettuata solo se ritenuta necessaria, dopo aver preso in considerazione i metodi alternativi disponibili e aver utilizzato quelli ritenuti appropriati. Al momento della stesura del presente metodo di prova aggiornato, esistono ancora casi in cui il ricorso a questo metodo di prova rimane indispensabile o obbligatorio nell'ambito di alcuni quadri regolamentari.

L'aggiornamento più recente si è concentrato principalmente sull'uso di analgesici e anestetici senza modificare il concetto di base e la struttura della linea guida. L'ICCVAM (2) e un gruppo internazionale di esperti scientifici indipendenti hanno esaminato l'utilità e i limiti di un ricorso sistematico ad anestetici per uso topico, ad analgesici sistemici e a endpoint umanitari durante la prova di sicurezza in vivo dell'irritazione oculare (12). Da questo esame è emerso che l'impiego di anestetici per uso topico e di analgesici sistemici permette di evitare agli animali la maggior parte, se non la totalità, del dolore e dello stress senza modificare il risultato della prova, e raccomanda che tali sostanze siano utilizzate in modo sistematico. Questo metodo tiene conto delle conclusioni di tale revisione. È pertanto opportuno che gli anestetici per uso topico, gli analgesici sistemici e gli endpoint umanitari siano utilizzati sistematicamente nell'ambito della sperimentazione in vivo dell'irritazione/corrosione oculare acuta. Qualsiasi eccezione deve essere giustificata. Le modifiche di cui al presente metodo contribuiranno in misura significativa a ridurre o evitare il dolore e lo stress degli animali nella maggior parte delle sperimentazioni che richiedono ancora una prova di sicurezza oculare in vivo.

Una gestione preventiva ed equilibrata del dolore comprende: i) un pretrattamento di routine con un anestetico a uso topico (ad es. proparacaina o tetracaina) e un analgesico sistemico (ad es. buprenorfina), ii) un programma di trattamento post-esposizione di routine con un analgesico sistemico (ad es. buprenorfina e meloxicam), iii) un programma di osservazione, monitoraggio e la registrazione dei segni clinici di dolore o di stress negli animali, e iv) un programma di osservazione e monitoraggio e la registrazione della natura, della gravità e della progressione di tutte le lesioni oculari. Ulteriori dettagli sono forniti nelle procedure aggiornate descritte di seguito. Dopo l'esposizione alla sostanza chimica in esame, non dovrà essere somministrato alcun anestetico o analgesico per uso topico supplementare, in modo da evitare qualsiasi interferenza con la prova. Gli analgesici con proprietà antinfiammatorie (come il meloxicam) non saranno oggetto di applicazione topica e le dosi utilizzate sistematicamente non devono interferire con gli effetti oculari.

Le definizioni sono riportate nell'Appendice del presente metodo di prova.

(1) Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE (G.U.L. 304 del 22.11.2007, pag. 1).

(2) The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

## CONSIDERAZIONI INIZIALI

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, non bisogna considerare il ricorso a prove in vivo finché non siano stati valutati, sulla base del peso dell'evidenza, tutti i dati disponibili pertinenti sulla potenziale corrosività/irritazione oculare della sostanza chimica. Tali dati comprendono le evidenze scientifiche derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, le evidenze di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o di miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza chimica (4) (5), nonché i risultati di prove in vitro o ex vivo validate ed accettate sulla corrosione e l'irritazione cutanea e oculare (6) (13) (14) (15) (16) (17). Gli studi possono essere stati condotti prima di un'analisi basata sul peso delle evidenze, o in conseguenza di essa.

Per alcune sostanze chimiche, un'analisi di questo tipo può indicare la necessità di studi in vivo del potenziale di corrosione/irritazione oculare. In tutti questi casi, prima di considerare il ricorso a prove oculari in vivo, va preferibilmente condotto uno studio sugli effetti della corrosione cutanea in vivo e/o in vitro della sostanza chimica, e valutato in base alla strategia di sperimentazione sequenziale nel metodo di prova B.4 (7) o alla strategia sperimentale integrata descritta nella linea guida ECHA (21).

La strategia di sperimentazione sequenziale, che prevede l'esecuzione di prove della corrosione/irritazione oculare in vitro o ex vivo validate, è riportata nell'Allegato al presente metodo di prova e, per le finalità del REACH, nella linea guida ECHA. Si raccomanda di seguire questa strategia prima di passare alla sperimentazione in vivo. Per le nuove sostanze chimiche, si raccomanda di adottare un approccio sperimentale graduale, per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza chimica. Se per le sostanze chimiche esistenti i dati sulla corrosione/irritazione oculare e cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per recuperare i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura sperimentale differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio sperimentale «per gradi.»

## PRINCIPIO DELLA PROVA IN VIVO

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

Gli animali che presentano segni di grave stress e/o dolore, in qualsiasi fase della prova, o lesioni compatibili con gli endpoint umanitari descritti nel presente metodo di prova (cfr. paragrafo 26) vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza chimica va valutata di conseguenza. I criteri da seguire nel decidere la soppressione non cruenta di animali moribondi o che soffrono gravemente formano oggetto di un documento orientativo dell'OCSE (8).

## PREPARAZIONE DELLA PROVA IN VIVO

### **Selezione delle specie**

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

### **Preparazione degli animali**

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

### **Condizioni di stabulazione e alimentazione.**

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

## PROCEDURA

**Utilizzo di anestetici topici e analgesici sistemici**

Le seguenti procedure sono raccomandate per ridurre o evitare dolore e stress nelle prove di sicurezza sugli occhi. Si può ricorrere a procedure alternative più efficaci o efficienti per ridurre o evitare il dolore e lo stress degli animali.

- Sessanta minuti prima dell'applicazione della sostanza chimica in esame, somministrare 0,01 mg/kg di buprenorfina per iniezione sottocutanea per conseguire un livello terapeutico di analgesia sistemica. Non esistono evidenze né si sospetta che la buprenorfina e altri analgesici oppiacei simili somministrati in modo sistemico alterino le reazioni oculari (12).
- Cinque minuti prima dell'applicazione della sostanza chimica in esame, applicare una o due gocce di anestetico oculare topico (ad es. cloridrato di proparacaina o cloridrato di tetracaina allo 0,5 %) in ciascun occhio. Si raccomanda l'uso di anestetici per uso topico che siano privi di conservanti, onde evitare qualsiasi interferenza con la prova. L'occhio di ciascun animale non trattato con la sostanza chimica in esame, ma trattato con l'anestetico per uso topico, serve da controllo. Qualora si sospetti che possa provocare dolore e stress intensi, la sostanza in esame non dovrebbe di norma essere testata in vivo. Tuttavia, quando sussiste un dubbio o se si rende necessaria la sperimentazione, è opportuno prendere in considerazione ulteriori somministrazioni di anestetico per uso topico ad intervalli di 5 minuti, prima dell'applicazione della sostanza chimica. Gli utenti dovrebbero essere consapevoli del fatto che applicazioni multiple di anestetici per uso topico possono aumentare leggermente la gravità delle lesioni causate dalla sostanza chimica e/o il periodo di riparazione di tali lesioni.
- Otto ore dopo dell'applicazione della sostanza chimica in esame, iniettare per via sottocutanea 0,01 mg/kg di buprenorfina e 0,5 mg/kg di meloxicam per mantenere un livello terapeutico costante di analgesia sistemica. Benché non vi siano dati che suggeriscano che il meloxicam ha effetti antinfiammatori sull'occhio quando è somministrato per via sottocutanea una volta al giorno, si devono attendere almeno otto ore dall'applicazione della sostanza chimica prima di somministrare il meloxicam al fine di evitare eventuali interferenze con la prova (12).
- Dopo il periodo iniziale di 8 ore, somministrare 0,01 mg/kg di buprenorfina per via sottocutanea ogni 12 ore, in congiunzione con 0,5 mg/kg di meloxicam per via sottocutanea ogni 24 ore, fintanto che siano risolte le lesioni oculari e che siano spariti tutti i sintomi clinici di dolore e stress. Tali analgesici sono disponibili in preparati a rilascio controllato cui si può ricorrere per ridurre la frequenza di somministrazione degli analgesici.
- Un trattamento analgesico «di emergenza» deve essere effettuato immediatamente dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame se gli analgesici e gli anestetici per uso topico somministrati in precedenza si rivelino inadeguati. Se un solo animale mostra segni di dolore o stress durante la sperimentazione, iniettare immediatamente una dose «di emergenza» di 0,03 mg/kg di buprenorfina per via sottocutanea e ripeterla ogni 8 ore (intervallo minimo), se necessario, invece di una dose di 0,01 mg/kg per via sottocutanea ogni 12 ore. Una dose di 0,5 mg/kg di meloxicam per via sottocutanea va somministrata ogni 24 ore in congiunzione con la dose «di emergenza» di buprenorfina, ma non prima di 8 ore dall'applicazione della sostanza chimica in esame.

**Applicazione della sostanza chimica in esame**

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

**Irrigazione**

Gli occhi degli animali sperimentali non vanno lavati per almeno 24 ore dopo l'instillazione della sostanza chimica in esame, tranne nel caso di sostanze solide (cfr. paragrafo 18) e nel caso di effetti corrosivi o irritanti immediati. Dopo 24 ore è possibile effettuare un lavaggio, se lo si considera necessario.

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

## **Livelli di dose**

### *(1) Saggio di liquidi*

Per testare le sostanze liquide si impiega una dose di 0,1 ml. Non usare spray per instillare la sostanza chimica direttamente nell'occhio; lo spray liquido va spruzzato e raccolto in un contenitore prima di instillarne 0,1 ml nell'occhio.

### *(2) Saggio di solidi*

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

### *(3) Saggio di aerosol*

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

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

## **Prova iniziale (prova di irritazione/corrosione oculare in vivo usando un solo animale)**

Si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente la prova in vivo usando un solo animale (si veda l'Allegato del presente metodo: Strategia di sperimentazione sequenziale per l'irritazione e la corrosione oculare). Le osservazioni devono consentire di determinare la gravità e la reversibilità delle lesioni prima di eseguire una prova di conferma su un secondo animale.

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

## **Prova di conferma (prova di irritazione oculare in vivo con animali supplementari)**

Se nella prova iniziale non si osservano effetti corrosivi o fortemente irritanti, confermare la reazione irritante o negativa su un massimo di altri due animali. Se nella prova iniziale è stato osservato un effetto irritante si raccomanda di eseguire il saggio di conferma in maniera sequenziale su un solo animale per volta, anziché esporre contemporaneamente i due animali. Se il secondo animale rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, interrompere la prova. Se i risultati delle prove sul secondo animale sono sufficienti per determinare la categoria di pericolo della sostanza chimica, è necessario interrompere la sperimentazione.

## **Periodo di osservazione**

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente l'entità e la reversibilità degli effetti osservati. Occorre tuttavia interrompere l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni di dolore o stress gravi (8). Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati di norma per 21 giorni successivamente alla somministrazione della sostanza chimica in esame. In caso di reversibilità prima dei 21 giorni, interrompere subito l'esperimento.

## Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni oculari

Gli occhi sono sottoposti ad un esame approfondito per individuare eventuali lesioni oculari un'ora dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame, e tale procedura va ripetuta almeno una volta al giorno. Nei primi tre giorni successivi gli animali vanno esaminati più volte al giorno per assicurare che si possa decidere di porre fine alla prova in tempo utile, se necessario. Gli animali sono sottoposti a esami di routine durante tutta la prova alla ricerca di segni clinici di dolore e/o di stress (ad esempio eccessivo scalpitare con le zampe, sfregamento ripetuto dell'occhio, eccessivo sbattere delle palpebre o eccessiva lacrimazione) (9) (10) (11), almeno due volte al giorno con un intervallo minimo di sei, o più frequentemente se necessario. Tali esami sono necessari per i) valutare correttamente i segni di dolore e stress degli animali al fine di dimostrare la necessità di aumentare il dosaggio di analgesici e ii) «valutare» gli animali per riconoscere segni conclamati di endpoint umanitari, in modo da decidere con cognizione di causa la soppressione incruenta degli animali e garantire che tali decisioni siano adottate in tempo utile. Per agevolare l'individuazione e la misurazione delle lesioni oculari e determinare se i criteri stabiliti ai fini della soppressione incruenta sono stati raggiunti, va utilizzata di routine una colorazione con fluoresceina nonché un microscopio con lampada a fessura se ritenuto opportuno (ad esempio per valutare la gravità della lesione in caso di ulcerazione della cornea). Fotografie digitali delle lesioni riscontrate possono essere raccolte come riferimento e per documentare in modo permanente l'estensione della lesione oculare. Gli animali devono essere sottoposti a sperimentazione per il tempo minimo necessario per ottenere informazioni definitive. Gli animali che presentano dolore o stress intensi vanno soppressi al più presto con metodi non cruenti e la sostanza chimica va valutata di conseguenza.

Sopprimere con metodi non cruenti gli animali che, dopo l'instillazione, presentano le seguenti lesioni oculari (si veda la tabella 1 per una descrizione dei gradi di lesione): perforazione corneale o ulcerazione corneale di rilievo, compreso stafiloma; sangue nella camera anteriore dell'occhio; opacità corneale di grado 4; assenza di riflesso pupillare alla luce (risposta dell'iride di grado 2) che persista per 72 ore; ulcerazione della membrana congiuntivale; necrosi della congiuntiva o della membrana nittitante; distacco epidermico. Tali lesioni sono infatti generalmente irreversibili. È inoltre opportuno considerare le seguenti lesioni oculari come endpoint umanitari, la cui insorgenza giustifica di porre termine alla prova prima che sia trascorso il periodo di osservazione di 21 giorni previsto. Si ritiene che tali lesioni prefigurino altre reazioni a una sostanza corrosiva o gravemente irritante e altre lesioni che probabilmente non saranno pienamente scomparse entro il periodo di osservazione di 21 giorni: lesioni profonde — come ad esempio un'ulcerazione della cornea oltre gli strati superficiali dello stroma), distruzione del lembo > 50 % (comprovato dallo scolorimento del tessuto congiuntivale) e un'infezione oculare acuta (secrezione purulenta). Una combinazione di: vascolarizzazione della superficie corneale (cioè, panno corneale) associata a una superficie macchiata di fluoresceina che non diminuisce nel tempo, sulla base di esami giornalieri; e/o all'assenza di ricrescita epiteliale 5 giorni dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame, può anche costituire un insieme di criteri pertinenti per giustificare la decisione di porre termine alla prova anticipatamente. Tuttavia, ciascuno di questi risultati preso isolatamente non è sufficiente a motivare la conclusione anticipata della sperimentazione. Qualora siano osservati effetti oculari gravi, occorre consultare un veterinario curante o specializzato in animali da laboratorio, o a personale debitamente formato a individuare le lesioni cliniche, per condurre un esame clinico che consenta di stabilire se la combinazione di tali reazioni implica una conclusione anticipata della sperimentazione. Si determinano i gradi della reazione oculare (congiuntiva, cornea e iride) a 1, 24, 48 e 72 ore dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame e se ne registrano i risultati (tabella 1). Gli animali che non sviluppano lesioni oculari possono essere soppressi non prima di 3 giorni dopo l'instillazione. Gli animali con lesioni oculari non gravi vanno tenuti sotto osservazione fino alla scomparsa delle lesioni, oppure per 21 giorni, momento in cui lo studio si conclude. Occorre effettuare le osservazioni e le registrazioni con intervalli minimi di 1 ora, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 7 giorni, 14 giorni e 21 giorni, con l'obiettivo di determinare lo stato delle lesioni e la loro reversibilità o irreversibilità. Talvolta è necessario eseguire le osservazioni con frequenza maggiore per stabilire se l'animale sperimentale debba essere sottoposto a morte non cruenta per considerazioni etiche o eliminata dalla prova a motivo di risultati negativi.

Per ogni esame si deve registrare il livello di lesione oculare (vedi tabella 1). Annotare anche qualsiasi altra lesione dell'occhio (ad es. panno corneale, macchie, alterazioni della camera anteriore) e qualsiasi effetto sistemico negativo.

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

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

## DATI E RELAZIONE

**Valutazione dei risultati**

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

**Relazione sulla prova**

La relazione sulla prova comprende le informazioni seguenti.

*Giustificazione della sperimentazione in vivo: analisi del peso dei dati relativi a prove precedenti, compresi i risultati della strategia di sperimentazione sequenziale:*

- descrizione dei dati pertinenti derivanti da prove precedenti;
- dati ricavati in ciascuna fase della strategia sperimentale;
- descrizione delle prove in vitro eseguite, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze chimiche in esame/di riferimento;
- descrizione dello studio di irritazione/corrosione cutanea in vivo eseguito, con i risultati ottenuti;
- analisi del peso delle evidenze per l'esecuzione dello studio in vivo.

*Sostanza chimica in esame:*

- dati di identificazione (ad es. denominazione chimica e, se disponibile, numero CAS, origine, purezza, impurità conosciute, numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità, reattività con l'acqua);
- se si tratta di una miscela, i componenti vanno identificati, compresi i dati di identificazione delle sostanze componenti la miscela (ad esempio le denominazioni chimiche e, se disponibili, i numeri CAS) e loro concentrazioni;
- dose applicata.

*Mezzo disperdente:*

- identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;
- giustificazione della scelta del mezzo disperdente.

*Animali sperimentali:*

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

*Anestetici e analgesici*

- dosi e tempi di somministrazione degli anestetici topici e degli analgesici sistemici;
- se si usa un anestetico locale, identificazione, purezza, tipo, dose e potenziale interazione con la sostanza chimica in esame.

**Risultati:**

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

**Discussione dei risultati.****Interpretazione dei risultati**

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

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

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 — 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. In Vitro, 2, 19 — 26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology in vitro 12, pp.483 — 524.
- (7) Capitolo B.4 del presente allegato, *Irritazione/corrosione cutanea acuta*.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.
- <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>
- (13) Capitolo B.40 del presente allegato, *Corrosione cutanea in vitro: test di resistenza elettrica transcutanea (TER)*.
- (14) Capitolo B.40bis. del presente allegato, *Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana*.
- (15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (16) Capitolo B.47 del presente allegato, *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*.
- (17) Capitolo B.48 del presente allegato, *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*.
- (18) U.S. EPA (2003), *Label Review Manual: 3rd Edition*, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) UN (2011), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.
- (20) 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)
- (21) ECHA, "Guida alle prescrizioni in materia di informazione e alla valutazione della sicurezza chimica", capitolo R.7a: Endpoint specific guidance.
- [http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information\\_requirements\\_r7a\\_en.pdf](http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf)

Tabella 1

**Classificazione delle lesioni oculari**

Cornea	Grado
Opacità: grado di densità (le misure vanno prese dalle zone più dense) (*)	
Assenza di ulcerazione e opacità	0
Zone di opacità sparse o diffuse (diverse dal lieve appannamento della normale lucentezza); dettagli dell'iride chiaramente visibili	1
Zone traslucide facilmente individuabili; dettagli dell'iride lievemente offuscati	2
Zona madreperlacea; nessun dettaglio visibile dell'iride; dimensioni della pupilla appena distinguibili	3

Cornea	Grado
Cornea opaca; iride non distinguibile attraverso l'opacità	4
Massimo possibile: 4	
Iride	
Normale	0
Pieghe notevolmente approfondite, congestione, edema, moderata iperemia circumcorneale; oppure iniezione; iride reattiva alla luce (una reazione lenta è considerata positiva)	1
Emorragia, distruzione macroscopica, oppure assenza di reazione alla luce	2
Massimo possibile: 2	
Congiuntive	
Rossore (relativo alla congiuntiva palpebrale e bulbare; escluse cornea e iride)	
Normale	0
Alcuni vasi sanguigni iperemici (iniettati)	1
Colore cremisi diffuso; singoli vasi non facilmente distinguibili	2
Rosso acceso diffuso	3
Massimo possibile: 3	
Chemosi	
Rigonfiamento (relativo alle palpebre e/o alle membrane nittitanti)	
Normale	0
Rigonfiamento appena superiore alla norma	1
Rigonfiamento evidente, con parziale eversione delle palpebre	2
Rigonfiamento, con palpebre semichiuse	3
Rigonfiamento, con palpebre più che semichiuse	4
Massimo possibile: 4	

(\*) Indicare la zona di opacità corneale

*Appendice*

## DEFINIZIONI

**Rapporto acido/alcalino:** per i preparati acidi, si tratta della quantità (g) di idrossido di sodio/100 g di preparazione necessaria per ottenere un determinato pH. Per i preparati alcalini, si tratta della quantità (g) di idrossido di sodio che equivale alla quantità (g) di acido solforico/100 g di preparazione necessaria per ottenere uno specifico pH (Young et al. 1988).

**Sostanza chimica:** una sostanza o una miscela.

**Non irritanti:** sostanze non classificate come irritanti oculari di categoria I, II o III dell'EPA; o irritanti oculari di categoria 1, 2, 2A o 2B nel sistema GHS; o di categoria 1 o 2 dell'UE (17) (18) (19).

**Corrosivo oculare:** a) sostanza chimica che causa lesioni irreversibili dei tessuti oculari; b) sostanza chimica classificata come irritante oculare di categoria 1 nel sistema GHS, categoria I dell'EPA, o categoria 1 dell'UE (17) (18) (19).

**Irritante oculare:** a) sostanza chimica che produce un'alterazione oculare reversibile; b) sostanza classificata come irritante oculare di categoria II o III dell'EPA, di categoria 2, 2A o 2B nel sistema GHS, o di categoria 1 o 2 dell'UE (17) (18) (19).

**Grave irritante oculare:** a) sostanza chimica che causa danni ai tessuti oculari non risolvibili entro 21 giorni dall'applicazione o indebolimento grave della vista; b) sostanze chimiche classificate come irritanti oculari di categoria 1 nel sistema GHS, di categoria I dell'EPA o di categoria 1 dell'UE (17) (18) (19).

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

**Approccio per gradi:** strategia sperimentale realizzata per stadi successivi nella quale sono riesaminate tutte le informazioni disponibili su una sostanza chimica in esame, secondo un ordine preciso, applicando un processo basato sul peso delle evidenze a ciascuno stadio, al fine di stabilire se vi sono informazioni sufficienti per prendere una decisione sulla classificazione del pericolo prima di procedere allo stadio successivo. Se è possibile assegnare un potenziale di irritazione alla sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili, non è necessario procedere a una prova supplementare. Se non è possibile assegnare un potenziale di irritazione alla sostanza chimica in esame in base alle informazioni disponibili, eseguire una sperimentazione sequenziale su animali fino a che non sarà possibile giungere a una classificazione inequivocabile.

**Peso dell'evidenza (processo):** i punti forti e deboli di un insieme di informazioni sono utilizzati come base per giungere ad una conclusione che potrebbe non essere evidente a partire dai dati presi individualmente.

---

**ALLEGATO DEL METODO DI PROVA B.5 <sup>(1)</sup>**

## STRATEGIA DI PROVE IN SEQUENZA PER L'IRRITAZIONE E LA CORROSIONE OCULARI

**Considerazioni generali**

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

Si raccomanda di svolgere un'analisi basata sul peso delle evidenze per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione oculare delle sostanze chimiche e determinare la necessità di altri studi, diversi da quelli in vivo sugli occhi, per meglio caratterizzare tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di applicare la strategia di sperimentazione sequenziale per ottenere i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze per le quali non è disponibile una documentazione sperimentale, usare la strategia di sperimentazione sequenziale per ottenere i dati necessari al fine di valutarne la corrosività/irritazione oculare. La strategia sperimentale iniziale descritta nel presente Allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1) e successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), approvata alla 28a riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2) e aggiornata da un gruppo di esperti dell'OCSE nel 2011.

Sebbene non sia parte integrante del metodo di prova B.5, questa strategia sperimentale esprime tuttavia l'approccio raccomandato per la determinazione delle proprietà di irritazione/corrosione oculare. Tale approccio rappresenta non solo una "migliore pratica" ma anche un punto di riferimento etico per l'esecuzione di prove in vivo sull'irritazione/corrosione oculare. Il metodo di prova fornisce indicazioni sull'esecuzione della prova in vivo e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione il ricorso a tale prova. La strategia di sperimentazione sequenziale fornisce un metodo di analisi basata sul peso delle evidenze per la valutazione dei dati esistenti sulle proprietà di irritazione/corrosione oculare delle sostanze chimiche e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze chimiche che necessitano ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. La strategia prevede dapprima l'esecuzione di prove validate ed accettate in vitro o ex vivo e successivamente di studi in base al metodo di prova B.4 in circostanze specifiche (3) (4).

**Descrizione della strategia sperimentale «per gradi»**

Prima di effettuare le prove nell'ambito della strategia di sperimentazione sequenziale (Figura), valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di eseguire prove oculari in vivo. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione basata sul peso delle evidenze, valutare tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza chimica in questione e dei suoi analoghi strutturali; siffatta decisione deve essere giustificata. Si dovrebbe attribuire innanzitutto importanza ai dati esistenti sulla sperimentazione della sostanza chimica su persone e animali, e successivamente ai risultati di prove in vitro o ex vivo. Ove possibile, evitare gli studi in vivo delle sostanze chimiche corrosive. I fattori considerati nella strategia sperimentale sono:

Valutazione dei dati esistenti sulle persone e/o sugli animali, e/o i dati in vitro derivanti da metodi validati e internazionalmente accettati (Fase 1)

<sup>(1)</sup> Per l'applicazione di una strategia sperimentale integrata per l'irritazione oculare nell'ambito del RACH, si veda anche la linea guida ECHA sugli obblighi di informazione e la valutazione della sicurezza chimica, capitolo R.7a: "Endpoint specific guidance", [http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information\\_requirements\\_r7a\\_en.pdf](http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf)

Considerare innanzitutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi) e/o dati relativi a prove su animali in studi sugli occhi e/o dati in vitro derivanti da metodi validati e internazionalmente accettati per la corrosione/irritazione oculare, in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sugli occhi. Successivamente valutare i dati disponibili di studi su soggetti umani e/o animali sulla corrosione/irritazione cutanee, e/o i dati in vitro derivanti da metodi validati e internazionalmente accettati per la corrosione/irritazione oculare. Non instillare negli occhi degli animali sostanze chimiche notoriamente corrosive o gravemente irritanti per l'occhio né sostanze chimiche che hanno effetti corrosivi o irritanti sulla pelle; tali sostanze chimiche vanno considerate corrosive e/o irritanti anche per gli occhi. Non testare in vivo sugli occhi sostanze chimiche per le quali, nell'ambito di precedenti studi oculari è stato dimostrato in misura sufficiente che non sono corrosive e non hanno potere irritante.

#### Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2)

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

#### Proprietà fisicochimiche e reattività chimica (Fase 3)

Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es.  $\leq 2,0$  o  $\geq 11,5$ , possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per identificare una sostanza chimica come corrosiva o irritante per gli occhi, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (5)(6)(7). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza chimica può non essere corrosiva per l'occhio (vale a dire sostanze chimiche con un pH estremo e un basso rapporto acido/alcalino), è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza facendo ricorso a una prova in vitro o ex vivo validata ed accettata (cfr. paragrafo 10).

#### Considerazione di altre informazioni esistenti (Fase 4)

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

#### Valutazione della corrosività cutanea della sostanza chimica, se richiesto a fini regolamentari (Fase 5)

Occorre valutare innanzitutto il potenziale di elevata irritazione/corrosione cutanea, usando il metodo di prova B.4 (4) e il suo Allegato (9), compreso l'uso di metodi di prova in vitro validati e internazionalmente accettati per la corrosione cutanea (9) (10) (11). Qualora si dimostri che la sostanza chimica provoca corrosione o grave irritazione cutanea, si può considerare che essa abbia anche potere corrosivo o gravemente irritante per gli occhi. In tal caso, non è necessario procedere a ulteriori prove. Se la sostanza chimica non è corrosiva o gravemente irritante per la pelle, va eseguita una prova oculare ex vivo o in vitro.

#### Risultati delle prove in vitro o ex vivo (Fase 6)

Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze chimiche che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in una prova in vitro o ex vivo (12) (13) che è stata validata ed accettata a livello internazionale per la valutazione specifica della corrosività/irritazione oculare. Si può presumere che tali sostanze chimiche produrranno effetti analogamente gravi anche in vivo. Qualora non siano disponibili prove in vitro/ex vivo validate ed accettate, saltare la Fase 6 e procedere direttamente alla Fase 7.

Prova in vivo sui conigli (Fasi 7 e 8)

Gli studi oculari in vivo devono cominciare con una prova iniziale su un solo animale. Se i risultati di questa prova indicano che la sostanza chimica è gravemente irritante o corrosiva per gli occhi, non si devono eseguire altre prove. Se invece la prova non rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, si esegue una prova di conferma con altri due animali. Potrebbero rendersi necessarie ulteriori prove in base ai risultati della prova di conferma. [Cfr. Metodo di prova B.5]

## STRATEGIA SPERIMENTALE E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

	Attività	Risultanza	Conclusione
1	<p>Dati esistenti sulle persone e/o sugli animali, e/ o i dati in vitro derivanti da metodi validati e internazionalmente accettati che dimostrano effetti sugli occhi</p> <p>Dati esistenti sulle persone e/o sugli animali, e/ o i dati in vitro derivanti da metodi validati e internazionalmente accettati che dimostrano effetti corrosivi sulla pelle</p> <p>Dati esistenti sulle persone e/o sugli animali, e/ o i dati in vitro derivanti da metodi validati e internazionalmente accettati che dimostrano effetti gravemente irritanti sulla pelle</p>	<p>Danno grave agli occhi</p> <p>Irritante per gli occhi</p> <p>Non corrosivo/non irritante per gli occhi</p> <p>Corrosivo per la pelle</p> <p>Gravemente irritante per la pelle</p>	<p>Endpoint apicale; Considerare corrosivo per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p> <p>Endpoint apicale; Considerare irritante per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p> <p>Endpoint apicale; Considerare non corrosivo e non irritante per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p> <p>Presumere corrosività per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p> <p>Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p>
	↓		
	<i>Nessuna informazione disponibile, oppure le informazioni disponibili non sono conclusive</i>		
	↓		
2	<p>Eseguire SAR per la corrosione/irritazione oculare</p> <p>Considerare analisi SAR per la corrosione cutanea.</p>	<p>Prevedere danni gravi agli occhi</p> <p>Prevedere irritazione degli occhi</p> <p>Prevedere corrosività per la pelle</p>	<p>Presumere corrosività per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p> <p>Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p> <p>Presumere corrosività per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p>
	↓		
	<i>Non è possibile fare previsioni, oppure le previsioni non sono conclusive o sono negative</i>		
	↓		
3	<p>Misurare il pH (capacità tampone, se pertinente)</p>	<p>pH <math>\leq 2</math> o <math>\geq 11,5</math> (con elevata capacità tampone, se pertinente)</p>	<p>Presumere corrosività per gli occhi. Non occorre sperimentazione.</p>
	↓		
	<i>2 &lt; pH &lt; 11,5, or pH <math>\leq 2</math> o <math>\geq 11,5</math> con capacità tampone scarsa/nulla, se pertinente</i>		
	↓		

	Attività	Risultanza	Conclusione
4	Considerare l'esistenza di tossicità sistemica per via cutanea.	Elevata tossicità a concentrazioni che andrebbero testate nell'occhio	La sostanza chimica sarebbe troppo tossica per la sperimentazione. Non occorre sperimentazione.
	↓		
	<i>Tali informazioni non sono disponibili, oppure la sostanza chimica non presenta elevata tossicità</i>		
	↓		
5	Procedere a una prova di corrosione cutanea conformemente alla strategia sperimentale di cui al capitolo B.4 del presente allegato se anche necessario per fini regolamentari	Reazione corrosiva o gravemente irritante	Presumere potere corrosivo per gli occhi. Non occorre ulteriore sperimentazione.
	↓		
	<i>La sostanza chimica non è corrosiva né gravemente irritante per la pelle</i>		
	↓		
6	Effettuare una o più prove oculari in vitro o ex vivo validate ed accettate	Reazione corrosiva o gravemente irritante  Reazione irritante  Reazione non irritante	Presumere corrosività e potere gravemente irritante per l'occhio, a condizione che la prova effettuata possa essere utilizzata per individuare le sostanze corrosive e gravemente irritanti e che la sostanza chimica in esame rientri nel campo di applicabilità della prova. Non occorre ulteriore sperimentazione.  Presumere potere irritante per l'occhio, a condizione che la prova effettuata possa essere utilizzata per individuare correttamente le sostanze corrosive, gravemente irritanti e irritanti e che la sostanza chimica in esame rientri nel campo di applicabilità della prova o delle prove. Non occorre ulteriore sperimentazione.  Presumere non irritante per l'occhio, a condizione che la prova o le prove effettuate possano essere utilizzate per individuare correttamente le sostanze non irritanti e distinguerle correttamente dalle sostanze chimiche irritanti, gravemente irritanti o corrosive oculari e che la sostanza chimica in esame rientri nel campo di applicabilità della prova. Non occorre ulteriore sperimentazione.
	↓		
	<i>Le prove in vitro o ex vivo, validate e accettate, sugli occhi non possono essere utilizzate per giungere ad una conclusione.</i>		
	↓		
7	Eseguire una prova oculare iniziale in vivo sui conigli usando un solo animale	Danno grave agli occhi	Considerare corrosivo per gli occhi. Non occorre ulteriore sperimentazione.
	↓		
	<i>Nessun danno grave o nessuna risposta</i>		
	↓		

	Attività	Risultanza	Conclusione
8	Eseguire una prova di conferma usando uno o due altri animali	Corrosivo o irritante	Considerare corrosivo o irritante per gli occhi. Non occorre ulteriore sperimentazione.
		Non corrosivo né irritante	Considerare non corrosivo e non irritante per gli occhi. Non occorre ulteriore sperimentazione.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 — 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Capitolo B.4 del presente allegato, Irritazione/corrosione cutanea acuta.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Lett., Suppl. *In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic. Toxicology in vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227 — 231.
- (8) Allegato del Capitolo B.4 del presente allegato, Strategia di sperimentazione sequenziale per l'irritazione e la corrosione oculare.
- (9) Capitolo B.40. del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: test di resistenza elettrica transcutanea (TER).
- (10) Capitolo B.40bis. del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana.
- (11) OECD (2006), Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (12) Capitolo B.47 del presente allegato, 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.
- (13) Capitolo B.48 del presente allegato, 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.»