

B.4 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI

1 METODA je v souladu s právem Evropských společenství^{7a)}.

1.1 ÚVOD

Při přípravě této aktualizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení s pokusnými zvířaty a hodnocení veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na pokusných zvířatech. Součástí této metody je doporučení, aby před provedením popsané zkoušky dráždivých a leptavých účinků látky na kůži *in vivo* byla vypracována analýza průkaznosti stávajících relevantních údajů. Pokud jsou k dispozici nedostatečné údaje, lze je rozpracovat využitím metody postupného zkoušení^{7a)}. Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* a je popsána v tabulce 8 k této metodě. Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení s pokusnými zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky látky vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech nebo pokusných zvířatech, důkazy leptavých nebo dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí takových látek, údaje dokládající silnou kyselost nebo zásaditost látky^{7a)} a výsledky validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}. Tato analýza by měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u látek, u nichž již existují důkazy z jiných studiích, pokud jde o tyto dva ukazatele.

V tabulce 8 k této metodě je uvedena upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných a uznaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD^{7a)}, jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS)^{7a)}. Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky níž lze dosáhnout vědecky spolehlivých údajů o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

Pokud pomocí analýzy průkaznosti výsledků nelze o leptavých nebo dráždivých účincích rozhodnout, měla by se v souladu se strategií postupného zkoušení uvážít zkouška *in vivo* (viz tabulka 8).

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na kůži: vyvolání vratných změn na kůži do 4 h po aplikaci zkoušené látky.

Leptavé účinky na kůži: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážít histopatologie.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete, přičemž oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

Pokusná zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o utracení umírajících a závažně trpících pokusných zvířat lze nalézt v literatuře^{7a)}.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava na zkoušku *in vivo*

1.4.1.1 *Výběr druhu pokusných zvířat*

Upřednostňovaným pokusným zvířetem je albín králíka a používají se mladá dospělá pokusná zvířata. Při použití jiného druhu by se mělo podat zdůvodnění.

1.4.1.2 *Příprava pokusných zvířat*

Pokusná zvířata jsou vybrána s ohledem na druh, pohlaví a stáří v souladu s ustanovením § 15 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾ a označena tak, aby byla možná identifikace jednotlivých pokusných zvířat. Dobu navykání stanoví § 10 zvláštního právního předpisu¹⁰⁾.

Asi 24 h před zahájením zkoušky se pokusným zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze pokusná zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Pokusná zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla u králíků být $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Ačkoliv by relativní vlhkost měla činit minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 % kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50 – 60 %. Osvětlení by mělo být umělé, mělo by se střídát 12 h světla a 12 h tmy, není-li v chovné místnosti denní světlo. Ke krmení lze použít obvyklé krmivo určené pro pokusná zvířata od registrovaného výrobce s neomezenou dodávkou pitné vody. Pokusná zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách v souladu s příslušným právním předpisem¹⁰⁾, pokud není stanoveno projektem pokusů jinak, ale počet pokusných zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého pokusného zvířete.

1.4.2 **Postup zkoušky**

1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm^2) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý styk s kůží a rovnoměrné rozložení látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se pokusné zvíře dostalo k mulu a zkoušenou látku požilo nebo vdechlo.

Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach) se zkoušená látka navlhčí nejmenším množstvím vody (nebo podle potřeby jiným vhodným vehikulem) dostatečným k zajištění dobrého styku s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené látky na kůži pouze minimální.

Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 h, se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

1.4.2.2 *Úroveň dávek*

Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g tuhé látky nebo pasty.

1.4.2.3 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži in vivo s použitím jednoho pokusného zvířete)*

Důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom pokusném zvířeti, zejména pokud existuje podezření, že látka má potenciální leptavé účinky. Tento postup je v souladu se strategií postupného zkoušení (viz tabulka 8).

Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků látka posouzena jako žíravá, není žádné další zkoušení na pokusných zvířatech nutné. U většiny látek, u nichž je podezření, že jsou žíravé, nejsou obvykle další zkoušky *in vivo* nezbytné. Avšak v těch případech, kde je kvůli nedostatku důkazů považováno za nezbytné zjistit další údaje, mohou být v omezené míře provedeny zkoušky na pokusných zvířatech podle tohoto postupu: pokusnému zvířeti se postupně přiloží nejvýše tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, odstraní se druhá náplast po jedné hodině. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, pokusné zvíře se pozoruje podobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.

V takových případech, kdy se u zkoušené látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu pokusnému zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

1.4.2.4 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži in vivo s dalšími pokusnými zvířaty)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na dvou dalších pokusných zvířatech, u každého s jednou náplastí s dobou expozice 4 h. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších pokusných zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem pokusným zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě pokusná zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí pokusné zvíře. Sporné reakce může být nutné zhodnotit na dalších pokusných zvířatech.

1.4.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy pokusné zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků

by se pokusná zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška by se měla v tomto okamžiku ukončit.

1.4.2.6 *Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže*

Všechna pokusná zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému a reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 h po odstranění náplastí se zkoušenou látkou. V počáteční zkoušce na jednom pokusném zvířeti se po odstranění náplastí okamžitě vyšetří také testovací místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce 9. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 h nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti účinků. Vedle pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). Pro objasnění sporných reakcí by se mělo uvážit histopatologické vyšetření.

Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebním laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže uvedená tabulka 9). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí^{7a)}.

2 **DATA**

2.1 **PŘEDKLÁDÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečném protokolu o zkoušce. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v části 3.1.

2.2 **HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ**

Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.

Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená látka za dráždivou.

3 **PROJEKT POKUSU, PROTOKOL POKUSU A ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

V souladu s příslušnými právními předpisy^{9),10)} musí být zpracován projekt pokusu a o průběhu pokusu je nutno vést protokol.

3.1 Zpráva o průběhu pokusu obsahuje tyto informace:

Zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/referenčními látkami,
- analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, šarže),
- fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita),
- pokud jde o směs, její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných pokusných zvířat, není-li použito albín králík,
- počet pokusných zvířat každého pohlaví,
- hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat na začátku a v závěru zkoušky,
- stáří na začátku studie,
- původ pokusných zvířat, podmínky chovu, krmivo atd.

Zkušební podmínky:

- technika přípravy oblasti kůže, na níž se nanese náplast,
- podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,
- podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

- údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého pokusného zvířete ve všech okamžicích měření,
- popis všech pozorovaných lézí,
- podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,
- popis jiných místních (např. odtučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

TABULKA 9: HODNOCENÍ KOŽNÍCH REAKCÍ

Tvorba erytému a příškvaru

Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

Maximálně možné: 4

Tvorba edému

Žádný edém	0
Velmi lehký edém (sotva patrný)	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)	4

Maximálně možné: 4

Pro objasnění sporných reakcí lze provést histopatologické vyšetření.

Tabulka 8

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení s pokusnými zvířaty je důležité vyhnout se zbytečnému používání pokusných zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u pokusných zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na kůži by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle jejího potenciálu vyvolávat leptavé nebo dráždivé účinky na kůži, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na pokusných zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých nebo leptavých účinků látky na kůži zhodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie jiné než kožní studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a její pomocí získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by měla být strategie postupného zkoušení využita k získání souboru údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich potenciálních leptavých nebo dráždivých účinků. Strategie zkoušení popsána v této tabulce 8 byla vypracována na semináři OECD^{7a)} a později potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998^{7a)}.

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.4, vyjadřuje doporučený postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na kůži. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Metoda zkoušení poskytuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, které by před zahájením takové zkoušky měly být zváženy. Tato strategie představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých/leptavých účincích zkoušených látek a odstupňovaný přístup k vytváření relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Doporučuje se také za určitých okolností provést validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* na zjištění dráždivých/leptavých účinků na kůži.

POPIS STRATEGIE VYHODNOCOVÁNÍ A ZKOUŠENÍ

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (tabulka 8 pokračování) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze významné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající informace by se měly vzít v úvahu jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích dotyčné látky nebo jejich obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na

průkaznosti výsledků. Mělo by se podat zdůvodnění tohoto rozhodnutí. Hlavní důraz by se měl klást na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení nebo údaje o zkouškách na pokusných zvířatech, např. z jednorázových nebo opakovaných studií dermální toxicity, protože z těchto údajů lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na kůži. Látky, jejichž dráždivé nebo leptavé účinky jsou známy, a látky, o nichž existují jednoznačné důkazy, že leptavé nebo dráždivé účinky nemají, není nutné zkoušet ve studiích *in vivo*.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka nebo pokusná zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků, lze předpokládat, že hodnocená zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz o neexistenci leptavých/dráždivých účinků látky. Ke stanovení potenciálních leptavých a dráždivých účinků na kůži by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2,0$ a $\geq 11,5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé účinky látky na kůži stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu)^{7a)}. Pokud lze podle pufrační kapacity soudit, že látka možná nemá leptavé účinky na kůži, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Dermální toxicita (krok 4). Pokud se ukáže, že chemická látka je při podání dermální cestou vysoce toxická, nemusí být studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, neboť množství zkoušené látky, které se obvykle nanáší, by mohlo přesáhnout vysoce toxickou dávku a mít za následek uhynutí nebo závažné utrpení pokusných zvířat. Navíc pokud byly studie dermální toxicity využívající albíny králíka již provedeny do limitní úrovně dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti nebo vyšší a nebyly zjištěny žádné dráždivé nebo leptavé účinky, nemusí být další zkoušky dráždivých/leptavých účinků na kůži nezbytné. Při hodnocení akutní dermální toxicity v předchozích studiích je nutné mít na paměti několik aspektů. Např. zaznamenané informace o dermálních lézích nemusí být úplné. Zkoušení a pozorování mohlo být prováděno na jiných druzích než králík a citlivost reakcí jednotlivých druhů se může do značné míry lišit. Také forma zkoušené látky, která byla pokusným zvířatům podávána, nemusela být vhodná pro hodnocení dráždivých/leptavých účinků na kůži (např. ředění látek určených ke zkoušení dermální toxicity)^{7a)}. Avšak v takových případech, kdy byly na králících provedeny dobře navržené a realizované studie dermální toxicity, lze negativní nálezy považovat za dostatečné důkazy, že látka není žíravá nebo dráždivá.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé účinky ve validované a uznané zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo*^{7a)}, jejímž cílem bylo hodnocení specifických účinků, není nutné zkoušet na pokusných zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky.

Zkouška in vivo na králících (kroky 7 a 8). Pokud je k provedení zkoušení *in vivo* nutné rozhodnutí založené na průkaznosti výsledku, mělo by toto zkoušení začínat s počáteční zkouškou na jednom pokusném zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé účinky na kůži, nemělo by se další zkoušení provádět. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit maximálně na dvou dalších pokusných zvířatech po dobu expozice 4 h. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších pokusných zvířat současně.

Tabulka 8 pokračování

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DRÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI

Aktivita	Nález	Závěr
1 Existující údaje o účincích látky na kůži nebo sliznice u člověka nebo u pokusných zvířat	Žíravá	Dominantní ukazatel; považována za žíravou. Není nutné zkoušet.
	Dráždivá	Dominantní ukazatel; považována za dráždivou. Není nutné zkoušet.
	Nežíravá/nedráždivá	Dominantní ukazatel; považována za nežíravou nebo nedráždivou. Není nutné zkoušet.
↓		
<i>Nejsou k dispozici žádné informace, nebo informace nejsou přesvědčivé</i>		
↓		
2 Proveďte hodnocení leptavých/dráždivých účinků na kůži podle analýzy SAR	Předpoklad závažného poškození kůže	Považována za žíravou. Není nutné zkoušet.
	Předpoklad dráždivých účinků na kůži	Považována za dráždivou. Není nutné zkoušet.
↓		
<i>Nelze stanovit žádné předpoklady, nebo jsou předpoklady nepřesvědčivé nebo negativní</i>		
↓		
3 Změřte pH (s ohledem na pufrací kapacitu, pokud je významná)	pH ≤ 2 nebo $\geq 11,5$ (s vysokou pufrací kapacitou, pokud je významná)	Předpokládané leptavé účinky. Není nutné zkoušet.
↓		
<i>$2 < pH < 11,5$, nebo $pH \leq 2,0$ nebo $\geq 11,5$ s nízkou nebo žádnou pufrací kapacitou, pokud je to relevantní</i>		
↓		

4	<p>Vyhodnoťte údaje o systémové toxicitě dermální cestou¹</p>	<p>Vysoce toxická</p> <p>Nežiravá nebo nedráždivá při zkouškách na králících do limitní dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti nebo vyšší</p>	<p>Není třeba žádné další zkoušení.</p> <p>Předpokládaný nežiravý nebo nedráždivý charakter látky. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
	<p>↓</p> <p><i>Takové informace nejsou k dispozici, nebo nejsou přesvědčivé</i></p> <p>↓</p>		
5	<p>Proveďte validovanou a uznanou zkoušku leptavých účinků na kůži <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i></p>	<p>Leptavé účinky</p>	<p>Předpokládaná žíravost <i>in vivo</i>. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
	<p>↓</p> <p><i>Látka není žíravá</i></p> <p>↓</p>		
6	<p>Proveďte validovanou a uznanou zkoušku dráždivých účinků na kůži <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i></p>	<p>Dráždivé účinky</p>	<p>Předpokládaná dráždivost <i>in vivo</i>. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
	<p>↓</p> <p><i>Validované metody zkoušení dráždivých účinků na kůži <i>in vitro</i> nebo <i>ex vivo</i> ještě nejsou k dispozici nebo látka není dráždivá</i></p> <p>↓</p>		
7	<p>Proveďte počáteční zkoušku na králících <i>in vivo</i> na jednom pokusném zvířeti</p>	<p>Závažné poškození kůže</p>	<p>Považována za žíravou. Není třeba žádné další zkoušení.</p>
	<p>↓</p> <p><i>Žádné závažné poškození</i></p> <p>↓</p>		
8	<p>Proveďte potvrzující zkoušku na jednom nebo dvou pokusných zvířatech</p>	<p>Žíravá nebo dráždivá</p> <p>Nežiravá nebo nedráždivá</p>	<p>Považována za žíravou nebo dráždivou. Není třeba žádné další zkoušení.</p> <p>Považována za nežiravou nebo nedráždivou. Není třeba žádné další zkoušení.</p>

¹ Lze zvážit kroky 2 a 3.