

## KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 1152/2010

af 8. december 2010

om ændring med henblik på tilpasning til den tekniske udvikling af Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF <sup>(1)</sup>, særlig artikel 13, stk. 3, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 <sup>(2)</sup> indeholder de forsøgsmetoder til bestemmelse af stoffers fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet, der skal anvendes i forbindelse med forordning (EF) nr. 1907/2006.
- (2) Det er nødvendigt at ajourføre forordning (EF) nr. 440/2008 ved, at der med høj prioritet indsættes to nye *in vitro*-forsøgsmetoder for øjenirritation, som OECD har vedtaget for nylig, således at antallet af dyr, der anvendes til forsøg, begrænses til et minimum i over-

ensstemmelse med Rådets direktiv 86/609/EØF af 24. november 1986 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om beskyttelse af dyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål <sup>(3)</sup>. De interesserede parter er blevet hørt om dette udkast.

- (3) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør derfor ændres i overensstemmelse hermed.
- (4) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra det udvalg, der er oprettet i henhold til artikel 133 i forordning (EF) nr. 1907/2006 —

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

## Artikel 1

I del B i bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 indsættes kapitel B.47 og B.48 som anført i bilaget til nærværende forordning.

## Artikel 2

Nærværende forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Nærværende forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 8. december 2010.

På Kommissionens vegne  
José Manuel BARROSO  
Formand

<sup>(1)</sup> EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

<sup>(2)</sup> EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1.

<sup>(3)</sup> EFT L 358 af 18.12.1986, s. 1.

## BILAG

## »B.47. OKSECORNEA-UKLARHEDS- OG -PERMEABILITETSTESTMETODEN (BCOP-TESTMETODEN) TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER

## INDLEDNING

1. Oksecornea-uklarheds- og -permeabilitetstestmetoden (BCOP [Bovine Corneal Opacity and Permeability]-testmetoden) er en *in vitro*-testmetode, som under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger kan anvendes til at klassificere stoffer og blandinger som »øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer« (1) (2) (3). For denne testmetode er stærkt øjenirriterende stoffer defineret som dem, der inducerer øjenlæsioner, der persisterer hos kaninen i mindst 21 dage efter administration. Selv om den ikke betragtes som gyldig som fuldstændig erstatning for *in vivo*-kaninøjentesten, anbefales BCOP anvendt som del af en trindelt testningsstrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning inden for et specifikt anvendelsesområde (domæne) (4) (5). Teststoffer og -blandinger (6) kan klassificeres som øjenætsende stoffer eller stærkt øjenirriterende stoffer uden yderligere testning hos kaniner. Et stof, der er testet negativt, vil skulle testes hos kaniner ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi som anført i OECD Test Guideline 405 (7) (kapitel B. 5 i dette bilag).
2. Formålet med denne testmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et teststofs potentielle øjenætsning eller stærke øjenirritation som målt ved dets evne til at inducere uklarhed og øget permeabilitet i en isoleret oksecornea. Toksiske virkninger på cornea måles ved: (i) nedsat lystransmission (uklarhed) og (ii) øget passage af farvestoffet natriumfluorescein (permeabilitet). Uklarheds- og permeabilitetsvurderingerne af cornea efter eksponering for et teststof kombineres til udledning af en *in vitro*-irritationscore (IVIS, *In Vitro Irritancy Score*), som anvendes til at klassificere teststoffets irritationsniveau.
3. Øjenirriterende stoffer, som inducerer læsioner, der forsvinder på mindre end 21 dage, og ikke-øjenirriterende stoffer er også testet ved anvendelse af BCOP-testmetoden. BCOP-testmetodens nøjagtighed og pålidelighed for stoffer i disse kategorier er imidlertid ikke vurderet formelt.
4. Definitioner findes i tillæg 1.

## INDLEDENDE BETRAGTNINGER OG BEGRÆNSNINGER

5. Denne testmetode er baseret på Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) BCOP Test Method Protocol (8), som blev udviklet efter en international valideringsundersøgelse (4) (5) (9) med bidrag fra European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM). Protokollen er baseret på oplysninger fra Institute for In Vitro Sciences (IIVS) og INVITTOX Protocol 124 (10), som er den protokol, der blev anvendt til den af De Europæiske Fællesskaber sponsorerede prævalideringsundersøgelse af BCOP-assayet, som blev gennemført i 1997-1998. Begge disse protokoller er baseret på BCOP-assaymetodikken, som først blev rapporteret af Gautheron *et al.* (11).
6. De identificerede begrænsninger for denne testmetode er baseret på de høje falsk positiv-rater for alkoholer og ketoner og den høje falsk negativ-rate for faste stoffer i valideringsdatabasen (se punkt 44) (5). Når stoffer i disse kemiske og fysiske stofgrupper udelukkes fra databasen, forbedres BCOP's nøjagtighed på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne væsentligt (5). Som følge af formålet med dette assay (dvs. alene identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer) er falsk negativ-rater ikke kritiske, eftersom sådanne stoffer efterfølgende vil blive testet hos kaniner eller med andre tilstrækkeligt validerede *in vitro*-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi med en »weight of evidence«-tilgang. Den nuværende valideringsdatabase har desuden ikke muliggjort en tilstrækkelig vurdering af visse kemiske stofgrupper eller produktgrupper (f.eks. blandinger). Undersøgerne vil imidlertid kunne overveje at anvende denne testmetode til alle typer af testmateriale (herunder blandinger), hvor et positivt resultat vil kunne accepteres som indikativt for en øjenætsningsrespons eller svær øjenirritationsrespons. Positive resultater for alkoholer eller ketoner bør dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.
7. Alle procedurer med okseøjne og oksecorneae skal følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (12).
8. Testmetoden har den begrænsning, at selv om den tager højde for nogle af de øjenvirkninger, som vurderes i kaninøjenirritationstestmetoden, og til en vis grad deres svarhedsgrad, tager den ikke højde for conjunctiva- og irisskader. Desuden kan reversibiliteten af cornealæsioner ikke vurderes i sig selv med BCOP-assayet, men det er på grundlag af kaninøjenundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsiensdybde kan anvendes til at skelne mellem irreversible og reversible virkninger (13). Endelig muliggør BCOP-testmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

9. Der er bestræbelser i gang for yderligere at karakterisere anvendeligheden af og begrænsningerne for BCOP-assayet til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (se også punkt 45). Brugere opfordres også til at forsyne valideringsorganisationer med prøver og/eller data med henblik på formel vurdering af mulige fremtidige anvendelser af BCOP-testmetoden, herunder anvendelse til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer.
10. Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 2. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af BCOP-testmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af BCOP-assaydata med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

#### PRINCIP FOR TESTMETODEN

11. BCOP-testmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder normal fysiologisk og biokemisk funktion af oksecornea *in vitro*. Ved denne testmetode vurderes teststoffets beskadigende virkning ved kvantitative målinger af ændringer i cornea-uklarhed og -permeabilitet med henholdsvis et opacitometer og et spektrofotometer til synligt lys. Begge målinger anvendes til at beregne en IVIS, som anvendes til at tildele en *in vitro*-irritationsfareklassificeringskategori med henblik på forudsigelse af et teststofs *in vivo*-øjenirritationspotentiale (se Beslutningskriterier).
12. I BCOP-testmetoden anvendes isolerede corneae fra øjnene fra friskslagtet kvæg. Cornea-uklarhed måles kvantitativt som omfanget af lystransmission gennem cornea. Permeabilitet måles kvantitativt som mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der passerer gennem den fulde tykkelse af cornea som detekteret i mediet i det bageste kammer. Teststofferne tilføres til cornea-epitelooverfladen ved tilsætning til corneaholderens forreste kammer. I tillæg 3 findes en beskrivelse af og et diagram over en corneaholder, som anvendes i BCOP-testmetoden. Corneaholdere kan købes i handelen fra forskellige kilder eller konstrueres.

#### Kilde til okseøjne og deres alder samt udvælgelse af dyrearter

13. Kvæg, som sendes til slagterier, aflives typisk enten med henblik på anvendelse til konsum eller anden kommerciel udnyttelse. Kun raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes som kilde til corneae til brug i BCOP-testen. Eftersom vægtintervallet for kvæg er bredt og afhænger af race, alder og køn, er der ingen anbefalet vægt for dyrene på slagtetidspunktet.
14. Der kan forekomme variationer i corneadimensioner ved anvendelse af øjne fra dyr med forskellig alder. Corneae med en vandret diameter  $> 30,5$  mm og værdier for den centrale corneatykkelse (CCT) på  $\geq 1\,100\ \mu\text{m}$  stammer i almindelighed fra kvæg, som er mere end otte år gamle, mens corneae med en vandret diameter  $< 28,5$  mm og CCT  $< 900\ \mu\text{m}$  i almindelighed stammer fra kvæg, som er mindre end fem år gamle (14). Derfor anvendes der typisk ikke øjne fra kvæg, som er mere end 60 måneder gamle. Øjne fra kvæg, som er mindre end 12 måneder gamle, har traditionelt ikke været anvendt, eftersom disse øjne stadig er i udviklingsfasen, og corneatykkelsen og -diameteren er betydeligt mindre end det rapporterede for øjne fra voksent kvæg. Anvendelse af corneae fra yngre (dvs. 6-12 måneder gamle) dyr er imidlertid tilladelig, eftersom det giver visse fordele, såsom øget tilgængelighed, et snævert aldersinterval og nedsat risiko for potentiel arbejdstagereksposering for bovin spongiform encefalopati (BSE) (15). Da yderligere vurdering af betydningen af corneastørrelse eller -tykkelse for responsen på ætsende og irriterende stoffer ville være nyttig, opfordres brugerne til at rapportere den estimerede alder og/eller vægt for de dyr, hvorfra de corneae, der undersøges, stammer.

#### Indsamling og transport af øjne til laboratoriet

15. Øjnene indsamles af slagteriarbejdere. For at minimere mekanisk og anden beskadigelse af øjnene skal de enukleeres hurtigst muligt efter dyrenes aflivning. For at hindre, at øjnene eksponeres for potentielt irriterende stoffer, må slagteriarbejderne ikke anvende rensningsmiddel, når de skyller dyrenes hoveder.
16. Øjnene skal nedsænkes helt i Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i en beholder med en passende størrelse og transporteres til laboratoriet på en sådan måde, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Eftersom øjnene indsamles under slagteprocessen, vil de kunne blive eksponeret for blod og andre biologiske substanser, herunder bakterier og andre mikroorganismer. Det er derfor vigtigt at sikre, at risikoen for kontaminering minimeres (f.eks. ved at opbevare beholderen med øjnene på våd is, ved at tilsætte antibiotika til den HBSS, som øjnene opbevares i under transport [f.eks. penicillin i en koncentration på 100 IE/ml og streptomycin i en koncentration på 100 mg/ml]).
17. Tidsintervallet mellem indsamling af øjnene og anvendelsen af corneae i BCOP-testen skal minimeres (typisk indsamling og anvendelse samme dag), og det skal påvises, at intervallets varighed ikke påvirker assayresultaterne negativt. Disse resultater er baseret på udvælgelseskriterierne for øjnene, såvel som de positive og negative kontrolresponsen. Alle de øjne, som anvendes i assayet, skal stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

**Udvælgelseskriterier for øjne, der anvendes i BCOP-testen**

18. Når øjnene er ankommet til laboratoriet, undersøges de omhyggeligt for defekter, herunder øget uklarhed, ridser og neovaskularisering. Der anvendes kun corneae fra øjne, som er fri for sådanne defekter.
19. Kvaliteten af hver enkelt cornea vurderes også på senere assaytrin. Corneae med en uklarhed på mere end syv uklarhedsenheder (BEM/ÆRK: opacitometeret skal kalibreres med uklarhedsstandarder, som anvendes til at fastlægge uklarhedsenhederne, se tillæg 3) efter en indledende entimes ligevægtsindstillingsperiode skal kasseres.
20. Hver behandlingsgruppe (teststof, samtidige negative og positive kontroller) består af minimum tre øjne. Der skal anvendes tre corneae som negative kontrolcorneae i BCOP-assayet. Eftersom alle corneae excideres fra det hele øjeåbne og anbringes i corneakamrene, er der mulighed for håndteringsforårsagede artefakter i de individuelle cornea-uklarheds- og -permeabilitetsværdier (inklusive negativ kontrol). Uklarheds- og permeabilitetsværdierne for de corneae, der fungerer som negativ kontrol, anvendes desuden til at korrigere uklarheds- og -permeabilitetsværdierne for testartikel- og positiv kontrol-behandlede corneae i IVIS-beregningerne.

**TESTPROCEDURE****Klargøring af øjnene**

21. Corneae, som er fri for defekter, fridissekeres således, at der stadig er en 2-3 mm sclerakant tilbage til hjælp ved efterfølgende håndtering, idet det tilstræbes at undgå at beskadige cornea-epitelet og -endotelet. Isolerede corneae anbringes i specialdesignede corneaholdere, der består af forreste og bageste rum, som grænser op til henholdsvis epitel- og endotelsiden af cornea. Begge kamre fyldes rigeligt op med forvarmet Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (bageste kammer først), idet det sikres, at der ikke dannes bobler. Derpå bringes anordningen i ligevægt ved  $32 \pm 1$  °C i mindst en time for at gøre det muligt for corneae at komme i ligevægt med mediet og opnå normal metabolisk aktivitet i den grad, det er muligt (den tilnærmelsesvis temperatur af cornea-overfladen *in vivo* er 32 °C).
22. Efter ligevægtsindstillingsperioden tilsættes frisk forvarmet EMEM til begge kamre, og der aflæses basislinje-uklarhed for hver cornea. Alle corneae, som har makroskopisk vævsbeskadigelse (f.eks. ridser, pigmentering, neovaskularisering) eller en uklarhed  $> 7$  uklarhedsenheder, kasseres. Den gennemsnitlige uklarhed for alle corneae, som er bragt i ligevægt, beregnes. Minimum tre corneae med uklarhedsværdier tæt på medianværdien for alle corneae udvælges som negative (eller opløsningsmiddel-) kontrolcorneae. De resterende corneae fordeles derpå i en behandlingsgruppe og en positiv kontrolgruppe.
23. Eftersom varmekapaciteten for vand er højere end for luft, giver vand mere stabile temperaturbetingelser til inkubering. Derfor anbefales det at benytte et vandbad til at holde corneaholderen og dens indhold ved  $32 \pm 1$  °C. Der kan dog også anvendes luftinkubatorer under forudsætning af omhyggelig opretholdelse af temperaturstabilitet (f.eks. ved forvarmning af holdere og medier).

**Applikation af teststoffet**

24. Der anvendes to forskellige behandlingsprotokoller - en for væsker og overfladeaktive stoffer (faste stoffer eller væsker) og en for ikke-overfladeaktive stoffer.
25. Væsker testes ufortyndede, mens overfladeaktive stoffer testes ved en koncentration på 10 % vægt/volumen i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt. Halvfaste stoffer, cremer og vokser testes typisk som væsker. Der skal gives passende begrundelse for alternative fortyndingskoncentrationer. Corneae eksponeres for væsker og overfladeaktive stoffer i 10 minutter. Anvendelse af andre eksponeringstider skal ledsages af tilstrækkeligt videnskabeligt rationale.
26. Ikke-overfladeaktive faste stoffer testes typisk som opløsninger eller opslæmninger ved en koncentration på 20 % i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt. Under visse omstændigheder og med behørig videnskabelig begrundelse kan faste stoffer også testes i ren form ved direkte applikation på cornea-overfladen ved anvendelse af metoden med åbent kammer (se punkt 29). Corneae eksponeres for faste stoffer i fire timer, men som for væsker og overfladeaktive stoffer kan der anvendes alternative eksponeringstider med tilstrækkeligt videnskabeligt rationale.
27. Der kan anvendes forskellige behandlingsmetoder alt efter teststoffets fysiske natur og kemiske egenskaber (f.eks. faste stoffer, væsker, viskøse kontra ikke-viskøse væsker). I den forbindelse er det absolut påkrævet at sikre, at teststoffet dækker epiteloverfladen tilstrækkeligt, og at det fjernes tilstrækkeligt under skylletrinene. Der anvendes typisk en metode med lukket kammer for ikke-viskøse til let viskøse flydende teststoffer, mens der typisk anvendes en metode med åbent kammer for halvviskøse og viskøse flydende teststoffer og for rene faste stoffer.

28. Ved metoden med lukket kammer indføres der tilstrækkeligt teststof (750 µl) til at dække cornea-epitelsiden i det forreste kammer gennem doseringshullerne på kammerets overside, og hullerne lukkes efterfølgende med kammerpropperne under eksponeringen. Det er vigtigt at sikre, at hver cornea eksponeres for et teststof i det rette tidsinterval.
29. Ved metoden med åbent kammer fjernes vindueslåseringen og glasvinduet fra det forreste kammer inden behandling. Kontrol- eller teststoffet (750 µl - nok teststof til at dække cornea helt) påføres direkte på cornea-epiteloverfladen ved anvendelse af en mikropipette. Hvis et teststof er vanskeligt at pipettere, kan teststoffet fyldes i en pipette med positiv fortrængning under tryk som hjælp til dosering. Pipettespidsen på pipetten med positiv fortrængning indsættes i sprøjtes doseringsspids, således at materialet kan fyldes over i fortrængningsspidsen under tryk. Samtidig trykkes sprøjtestemplet ned, efterhånden som pipetestemplet trækkes opad. Hvis der dukker luftbobler op i pipettespidsen, fjernes testartiklen (den presses ud), og processen gentages, indtil spidsen er fyldt uden luftbobler. Om nødvendigt kan der anvendes en normal sprøjte (uden kanyle), eftersom en sådan sprøjte dels muliggør afmåling af et nøjagtigt volumen teststof og dels letter applikation på cornea-epiteloverfladen. Efter doseringen sættes glasvinduet på plads på det forreste kammer for at genskabe et lukket system.

### **Inkubering efter eksponering**

30. Efter eksponeringsperioden fjernes teststoffet, den negative kontrol eller det positive kontrolstof fra det forreste kammer, og epitelet vaskes mindst tre gange (eller indtil der ikke længere er synlige tegn på teststof) med EMEM (som indeholder phenolrødt). Der anvendes phenolrødt-holdigt medium til skylning, eftersom et farveskift for phenolrødt kan anvendes som indikator for effektiviteten af bortskylning af sure eller basiske materialer. Corneae vaskes mere end tre gange, hvis indikatoren phenolrødt stadig er misfarvet (gul eller violet), eller hvis teststoffet stadig er synligt. Når teststoffet er fjernet fra mediet, foretages en afsluttende skylning af corneae med EMEM (uden phenolrødt). EMEM (uden phenolrødt) anvendes til afsluttende skylning for at sikre fjernelse af phenolrødt fra det forreste kammer inden uklarhedsmålingen. Derefter fyldes det forreste kammer igen med frisk EMEM uden phenolrødt.
31. For væsker eller overfladeaktive stoffer inkuberes corneae efter skylning i yderligere to timer ved  $32 \pm 1$  °C. Længere tid efter eksponering kan være nyttig under visse omstændigheder og kan overvejes i hvert enkelt tilfælde. Corneae, som er behandlet med faste stoffer, skylles grundigt ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode, men kræver ikke yderligere inkubering.
32. Ved afslutningen af inkuberingsperioden efter eksponeringen for væsker og overfladeaktive stoffer og ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode for ikke-overfladeaktive faste stoffer registreres uklarheden og permeabiliteten for hver cornea. Desuden observeres hver cornea visuelt, og væsentlige observationer registreres (f.eks. vævsafskalning, resterende teststof, uensartede uklarhedsmønstre). Disse observationer kan være vigtige, da de kan give sig udslag i variationer i opacitometeraflæsningerne.

### **Kontrolstoffer**

33. Der indgår samtidige negative eller opløsningsmiddel/vehikel-kontroller og positive kontroller i hvert forsøg.
34. Ved test af et flydende stof i en koncentration på 100 % medtages der ved BCOP-testmetoden en samtidig negativ kontrol (f.eks. 0,9 % natriumchloridopløsning eller destilleret vand), således at der kan detekteres ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Det sikrer også, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.
35. Ved test af fortyndet væske, overfladeaktivt stof eller fast stof medtages der ved BCOP-testmetoden en samtidig opløsningsmiddel/vehikel-kontrolgruppe, således at der kan detekteres ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Kun et opløsningsmiddel/vehikel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt, kan anvendes.
36. Der medtages et kendt øjenirriterende stof som samtidig positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere, at der induceres en passende respons. Eftersom BCOP-assayet anvendes i denne testmetode til identifikation af ætsende eller stærkt irriterende stoffer, skal den positive kontrol ideelt set være et referencestof, som inducerer en svær respons ved denne testmetode. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af irritationsresponsen imidlertid ikke være overdrevent stor.
37. Eksempler på positive kontroller for flydende teststoffer er dimethylformamid eller 1 % natriumhydroxid. Et eksempel på en positiv kontrol for faste teststoffer er 20 % (vægt/volumen) imidazol i 0,9 % natriumchloridopløsning.

38. Referencestoffer er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialer for ukendte kemikalier fra en særlig kemisk stofgruppe eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentialer for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponsen.

#### Målte endepunkter

39. Uklarhed bestemmes ud fra omfanget af lystransmission gennem cornea. Cornea-uklarhed måles kvantitativt ved hjælp af et opacitometer, hvorved der opnås uklarhedsværdier målt på en kontinuert skala.
40. Permeabilitet bestemmes ud fra mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag (dvs. fra epitelet på den udvendige cornea-overflade til endotelet på den indvendige cornea-overflade). Der tilsættes 1 ml natriumfluoresceinopløsning (henholdsvis 4 mg/ml ved test af væsker og overfladeaktive stoffer og 5 mg/ml ved test af ikke-overfladeaktive faste stoffer) til det forreste kammer i corneaholderen, som grænser op til epitelsiden af cornea, mens det bageste kammer, som grænser op til endotelsiden af cornea, fyldes med frisk EMEM. Derpå inkuberes holderen i vandret position i  $90 \pm 5$  min ved  $32 \pm 1$  °C. Mængden af natriumfluorescein, der kommer ind i det bageste kammer, måles kvantitativt ved hjælp af UV/VIS-spektrofotometri. Spektrofotometriske målinger vurderet ved 490 nm registreres som OD<sub>490</sub> (OD = optisk tæthed) eller absorbansværdier, som måles på en kontinuert skala. Fluoresceinpermeabilitetsværdierne bestemmes ved anvendelse af OD<sub>490</sub>-værdier, som er opnået med et spektrofotometer til synligt lys ved brug af en 1 cm standardvejlængde.
41. Der kan alternativt anvendes en 96-brønds mikrotiterpladeaf læser, forudsat at (i) pladeaf læserens lineære interval for bestemmelse af fluorescein-OD<sub>490</sub>-værdier kan fastlægges; og at (ii) volumen af fluoresceinprøverne i 96-brønds pladen er korrekt, således at der opnås OD<sub>490</sub>-værdier svarende til 1 cm standardvejlængden (dette kan kræve en helt fuld brønd [sædvanligvis 360 µl]).

#### DATA OG RAPPORTERING

##### Datavurdering

42. Efter at uklarhedsværdier og gennemsnitlige permeabilitets-(OD<sub>490</sub>)-værdier er korrigeret for baggrundsuklarheds- og negativ kontrol-permeabilitets-OD<sub>490</sub>-værdier, skal den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitets-OD<sub>490</sub>-værdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en empirisk udledt formel for at beregne en *in vitro*-irritationsscore (IVIS) for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\text{IVIS} = \text{gennemsnitlig uklarhedsværdi} + (15 \times \text{gennemsnitlig permeabilitets-OD}_{490}\text{-værdi})$$

Sina et al. (16) rapporterede, at denne formel blev udledt under interne og sammenlignende laboratorieundersøgelser. Data genereret for i alt 36 forbindelser i en undersøgelse med deltagelse af flere laboratorier blev underkastet flerdimensional analyse for at bestemme ligningen for den bedste tilpasning mellem *in vivo*- og *in vitro*-data. Denne analyse blev udført af forskere i to forskellige virksomheder, som udledte næsten identiske ligninger.

43. Uklarheds- og permeabilitetsværdierne bør også vurderes uafhængigt for at fastslå, om et teststof kun inducerede ætsning eller stærk irritation ud fra ét af de to endepunkter (se Beslutningskriterier).

##### Beslutningskriterier

44. Et stof, som inducerer en IVIS  $\geq 55,1$ , defineres som et ætsende stof eller stærkt irriterende stof. Som anført i punkt 1 skal der, hvis teststoffet ikke identificeres som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof, gennemføres yderligere testning med henblik på klassificering og mærkning. BCOP-testmetoden har en generel nøjagtighed på 79 % (113/143) til 81 % (119/147), en falsk positiv-rate på 19 % (20/103) til 21 % (22/103) og en falsk negativ-rate på 16 % (7/43) til 25 % (10/40) i sammenligning med *in vivo*-kaninøjentestmetodedata klassificeret i henhold til EPA-(1), EU- (2) eller GHS- (3) klassificeringssystemerne. Når stoffer i visse kemiske (dvs. alkoholer, ketoner) eller fysiske (dvs. faste stoffer) stofgrupper udelukkes fra databasen, ligger nøjagtigheden af BCOP på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne fra 87 % (72/83) til 92 % (78/85), falsk positiv-raterne ligger fra 12 % (7/58) til 16 % (9/56), og falsk negativ-raterne ligger fra 0 % (0/27) til 12 % (3/26).
45. Selv hvis der ikke opnås en klassificering som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof for et teststof, kan BCOP-dataene være nyttige sammen med testdata fra *in vivo*-kaninøjentesten eller fra en tilstrækkeligt valideret *in vitro*-test til yderligere vurdering af anvendeligheden af og begrænsningerne for BCOP-testmetoden til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (et Guidance Document om anvendelse af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder er under udarbejdelse).



**Undersøgelsesacceptkriterier**

46. En test betragtes som acceptabel, hvis den positive kontrol giver en IVIS, der er inden for to standardafvigelse fra det aktuelle historiske gennemsnit, som skal ajourføres mindst hver tredje måned eller hver gang, der gennemføres en acceptabel test på laboratorier, hvor der sjældent gennemføres test (dvs. sjældnere end en gang om måneden). Negative eller opløsningsmiddel/vehikel-kontrolresponser skal resultere i uklarheds- og permeabilitetsværdier, der er mindre end de fastsatte øvre grænser for baggrundsuklarheds- og -permeabilitetsværdier for oksecorneae behandlet med den respektive negative kontrol eller opløsningsmiddel/vehikel-kontrol.

**Testrapport**

47. Testrapporten skal omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

*Test- og kontrolstoffer*

Kemisk(e) navn(e), såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes;

CAS-registreringsnummeret (RN), hvis det kendes;

renhed og sammensætning af stoffet eller blandingen (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige;

fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemisk stofgruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse;

behandling af test/kontrol-stofferne inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling);

stabilitet, hvis den kendes.

*Oplysninger om sponsoren og testfaciliteten*

Navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen;

identifikation af kilden til øjnene (dvs. den facilitet, hvor de er indsamlet);

opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for øjenindsamling, tidsinterval inden påbegyndelse af testning, transportmedier og temperaturbetingelser, eventuelle anvendte antibiotika);

særlige karakteristika ved de dyr, som øjnene er indsamlet fra (f.eks. donordyrenes alder, køn, vægt), hvis de er tilgængelige.

*Begrundelse for den anvendte testmetode og protokol**Testmetodeintegritet*

Den procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af testmetoden over tid (f.eks. periodisk testning af kompetencestoffer, anvendelse af historiske negative og positive kontroldata).

*Kriterier for en acceptabel test*

Acceptable samtidige positive og negative kontrolintervaller på grundlag af historiske data;

acceptable samtidige referencekontrolintervaller på grundlag af historiske data, hvis det er relevant.

*Testbetingelser*

Beskrivelse af det anvendte testsystem;

den anvendte corneaholdertype;

kalibreringsoplysninger for udstyr anvendt til måling af uklarhed og permeabilitet (f.eks. opacitometer og spektrofotometer);

oplysninger om de anvendte oksecorneae, herunder specifikation af deres kvalitet;

detaljer om den anvendte testprocedure;

anvendt(e) teststofkoncentration(er);

beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren;

reference til historiske data for modellen (f.eks. negative og positive kontroller, kompetencestoffer, referencestoffer);

beskrivelse af de anvendte vurderingskriterier.

#### Resultater

Angivelse i tabelform af data fra hver enkelt testprøve (f.eks. uklarheds- og OD<sub>490</sub>-værdier og beregnet IVIS for teststoffet og de positive kontroller, negative kontroller og referencekontrollerne [hvis de er medtaget] rapporteret i tabelform, herunder data fra flergangsbestemmelser/gentagne bestemmelser, hvis det er relevant, og gennemsnit  $\pm$  standardafvigelsen for hvert forsøg);

beskrivelse af andre observerede virkninger.

#### Diskussion af resultaterne

#### Konklusion

#### LITTERATUR

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

- (2) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EØS-relevant tekst). EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Se følgende websted:

[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)].

- (4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Erklæring om konklusionen på den retrospektive ICCVAM-undersøgelse af organotypiske *in vitro*-assays som screeningstest til identifikation af potentielle øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer). Se følgende websted:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (5) 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 Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].

- (6) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF. EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Se følgende websted:

[[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)].



- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. I: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
- (9) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)].
- (10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) 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. Se følgende websted:
- [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) 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.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (17) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].
- (18) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].

---

#### Tillæg 1

##### DEFINITIONER

**Cornea:** Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

**Corneapermeabilitet:** Kvantitativ måling af beskadigelsen af cornea-epitelet ud fra bestemmelse af mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag.

**Cornea-uklarhed:** Måling af graden af cornea-ugennemsigtighed efter eksponering for et teststof. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea. Uklarhed kan vurderes subjektivt som i Draize-kaninøjentesten eller objektivt med et instrument, såsom et »opacitometer«.

**EPA-kategori I:** Ætsende virkning (irreversibel ødelæggelse af øjenvæv) eller corneabeskadigelse eller -irritation, som persisterer mere end 21 dage (1).

**EU-kategori R41:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (2).

**Falsk negativ-rate:** Den andel af alle positive stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**Falsk positiv-rate:** Den andel af alle negative stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals [det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier]):** Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer, såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om stoffernes og blandingeres skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (3).

**GHS-kategori 1:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (3).

**Ikke-irriterende stof:** Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori I, II eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B.

**In vitro-irritationsscore (IVIS):** En empirisk udledt formel, som anvendes i BCOP-assayet, og hvorved den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitetsværdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en enkelt *in vitro*-score for hver behandlingsgruppe.  $IVIS = \text{gennemsnitlig uklarhedsværdi} + (15 \times \text{gennemsnitlig permeabilitetsværdi})$ .

**Negativ kontrol:** Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem. Denne prøve behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastslå, om opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

**Nøjagtighed:** Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans« forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til.

**Opacitometer:** Et instrument, som anvendes til at måle »cornea-uklarhed« ved kvantitativ vurdering af lystransmission gennem cornea. Det typiske instrument har to rum, som hver har sin egen lyskilde og fotocelle. Det ene rum anvendes til den behandlede cornea, mens det andet anvendes til at kalibrere og nulstille instrumentet. Lys fra en halogenlampe sendes gennem et kontrolrum (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgsrummet, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display.

**Opløsningsmiddel/vehikel-kontrol:** En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller vehiklet, og som behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge baselinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med teststoffet opløst i det samme opløsningsmiddel eller vehikel. Ved test sammen med en samtidig negativ kontrol påviser denne prøve også, hvorvidt opløsningsmidlet eller vehiklet interagerer med testsystemet.

**Positiv kontrol:** Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af den svære respons ikke være overdrevent stor.

**Potentiel fare:** Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

**Pålidelighed:** Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarheden inden for og mellem laboratorier og repeterbarheden inden for laboratorier.

**Referencestof:** Et stof, som anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: (i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; (ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; (iii) kendte fysiske/kemiske egenskaber; (iv) støttedata om kendte virkninger og (v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

**Stærkt øjenirriterende stof:** (a) Et stof, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade, som ikke er forsvundet inden for 21 dage efter applikation, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsettelse; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

**Trindeltestning:** Ved anvendelse af den trindelte testningsstrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et teststof i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en »weight of evidence«-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et teststofs irritationspotentiale kan fastsættes på grundlag af de eksisterende oplysninger, er der ikke behov for yderligere testning. Hvis et teststofs irritationspotentiale ikke kan fastsættes på grundlag af de eksisterende oplysninger, udføres en trinvis sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

**Valideret testmetode:** En testmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret testmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

**»Weight of evidence«:** En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

**Øjenirriterende stof:** (a) Et stof, der frembringer en reversibel ændring i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

**Øjenætsende stof:** (a) Et stof, som forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

---

## Tillæg 2

### Kompetencestoffer til BCOP-testmetoden

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af en testmetode, der følger denne testmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenætsnings-klassificeringen for de ti anbefalede stoffer i tabel 1. Disse stoffer er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for lokal øjen-irritation/ætsning, som er baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (TG 405) (dvs. stoffer, der i henhold til UN GHS er i kategori 1, 2A, 2B eller ikke er klassificeret og mærket) (3) (7). Hvad angår den validerede anvendelighed af disse assays (dvs. alene til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer), er der imidlertid kun to testudfald i relation til klassificering (ætsende stof/stærkt irriterende stof eller ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof), hvormed kompetencen kan godtgøres. Andre udvælgelseskriterier var, at stofferne er kommercielt tilgængelige, at der er tilgængelige *in vivo*-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for de to *in vitro*-metoder, for hvilke der er Test Guidelines under udarbejdelse. Derfor blev irriterende stoffer udvalgt fra den af ICCVAM anbefalede liste over 122 referencestoffer til validering af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder (se Appendix H, ICCVAM Recommended Reference Substances List) (5). Referencedata findes i ICCVAM Background Review Documents for BCOP-testmetoden og isoleret kyllingeøje-testmetoden (ICE [Isolated Chicken Eye]-testmetoden) (17) (18).

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af BCOP

Stof	CASRN	Kemisk stofgruppe <sup>(1)</sup>	Fysisk form	In vivo- klassificering <sup>(2)</sup>	In vitro-klassificering <sup>(3)</sup>
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniumforbindelse	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Dibenzoyl-L-vinsyre	2743-38-6	Carboxylsyre, ester	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Trichloredikesyre (30 %)	76-03-9	Carboxylsyre	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
2,6-dichlor-benzoyl-chlorid	4659-45-4	Acyhalogenid	Flydende	Kategori 2A	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ethyl-2-methylaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2B	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2A	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Flydende	Ikke mærket	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
n-hexan	110-54-3	Carbonhydrid (acyklisk)	Flydende	Ikke mærket	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

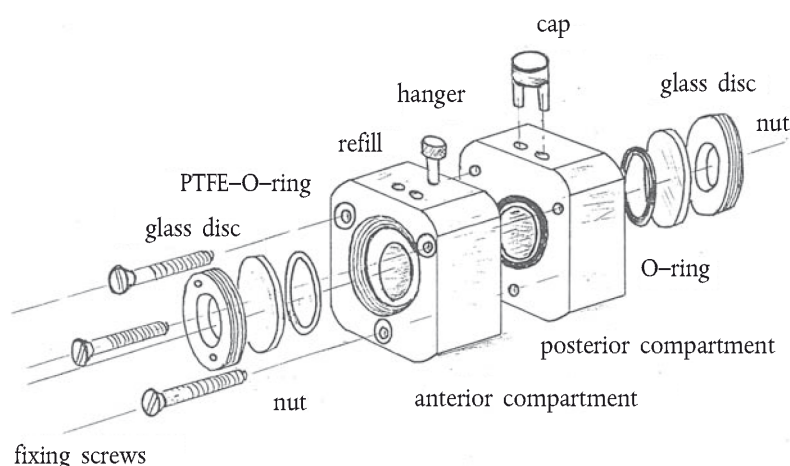
<sup>(1)</sup> De kemiske stofgrupper for hvert teststof blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).<sup>(2)</sup> Baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (OECD TG 405) og brug af UN GHS (3) (7).<sup>(3)</sup> Baseret på resultater fra BCOP og ICE.

## Tillæg 3

## BCOP-CORNEAHOLDEREN

1. BCOP-corneaholderne er fremstillet af et inaktivt materiale (f.eks. polypropylen). Holderne består af to halvdele (et forreste og et bageste kammer) og har to ens cylindriske indre kamre. Hvert kammer kan rumme et volumen på 5 ml og er afgrænset af et glasvindu, gennem hvilket der foretages uklarhedsmålinger. Hvert indre kammer har en diameter på 1,7 cm og en dybde på 2,2 cm <sup>(1)</sup>. Der er anbragt en o-ring på det bageste kammer for at forhindre lækager. Corneae anbringes med endotelsiden nedad på de bageste kamres o-ring, og de forreste kamre anbringes på epitelsiden af corneae. Kamrene holdes på plads med tre rustfri skruer, som er placeret på de udvendige kammerkanter. Der er placeret et glasvindu for enden af hvert kammer, som kan fjernes, så der er let adgang til cornea. Der er også anbragt en o-ring mellem det eksponerede corneaoverfladeareal og det bageste kamres volumen er det samme som forholdet i den traditionelle corneaholder. Det er nødvendigt for at sikre, at permeabilitetsværdierne bestemmes korrekt til beregning af IVIS ved hjælp af den foreslåede formel.

<sup>(1)</sup> De angivne dimensioner gælder for en corneaholder, som anvendes til køer i alderen fra 12 til 60 måneder. Hvis der anvendes dyr i alderen fra 6 til 12 måneder, vil holderen i stedet skulle konstrueres sådan, at hvert kammer kan rumme et volumen på 4 ml, og hvert af de indre kamre har en diameter på 1,5 cm og en dybde på 2,2 cm. For enhver nykonstrueret corneaholder er det meget væsentligt, at forholdet mellem det eksponerede corneaoverfladeareal og det bageste kamres volumen er det samme som forholdet i den traditionelle corneaholder. Det er nødvendigt for at sikre, at permeabilitetsværdierne bestemmes korrekt til beregning af IVIS ved hjælp af den foreslåede formel.



#### Ordforklaring

Glass disc: Glasplade

PTFE-O-ring: PTFE-O-ring

Refill: Påfyldning

Hanger: Ophæng

Cap: Hætte

Nut: Møtrik

O-ring: O-ring

Posterior compartment: Bageste kammer

Anterior compartment: Forreste kammer

Fixing screws: Fastgørelsesskruer

#### OPACITOMETERET

- Opacitometeret er en anordning til måling af lystransmission. Lys fra en halogenlampe sendes gennem et kontrolrum (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgsrummet, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display. Uklarhedsenhederne fastlægges.
- Opacitometeret skal give en lineær respons for en række uklarheds aflæsninger, som omfatter de til de forskellige klassificeringer anvendte tærskelværdier, som er beskrevet med den anvendte Prediction Model (dvs. op til den tærskelværdi, som er bestemmende for klassificering som ætsning/stærk irritation). For at sikre lineære og nøjagtige aflæsninger op til 75-80 uklarhedsenheder er det nødvendigt at kalibrere opacitometeret ved hjælp af en række kalibratorer. Kalibrаторerne (uigennemsigtige polyesterark) anbringes i kalibreringskammeret (et corneakammer, som er konstrueret til at rumme kalibrаторerne), hvorefter opacitometeret aflæses. Kalibreringskammeret er konstrueret til at rumme kalibrаторerne i ca. samme position mellem lyset og fotocellen, som corneae vil blive anbragt i under uklarhedsmålingerne. Opacitometeret kalibreres først til 0 uklarhedsenheder ved anvendelse af kalibreringskammeret uden isat kalibrатор. Derpå anbringes tre forskellige kalibrаторer en efter en i kalibreringskammeret, og uklarhederne måles. Kalibrатор 1, 2 og 3 skal give uklarheds aflæsninger svarende til deres forud fastsatte værdier på henholdsvis 75, 150 og 225 uklarhedsenheder  $\pm 5\%$ .

**B.48. ISOLERET KYLLINGEØJE-TESTMETODEN (ICE-TESTMETODEN) TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER****INDLEDNING**

1. Isoleret kyllingeøje-testmetoden (ICE [Isolated Chicken Eye]-testmetoden) er en *in vitro*-testmetode, som under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger kan anvendes til at klassificere stoffer og blandinger som »øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer« (1) (2) (3). I denne testmetode er stærkt irriterende stoffer defineret som dem, der inducerer øjenlæsioner, der persisterer hos kaninen i mindst 21 dage efter administration. Selv om den ikke betragtes som gyldig som fuldstændig erstatning for *in vivo*-kaninøjentesten, anbefales ICE anvendt som del af en trindelt testningsstrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning inden for et specifikt anvendelsesområde (domæne) (4) (5). Teststoffer og -blandinger (6), som er positive i dette assay, kan klassificeres som øjenætsende stoffer eller stærkt øjenirriterende stoffer uden yderligere testning hos kaniner. Et stof, der er testet negativt, vil skulle testes hos kaniner ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi som anført i OECD Test Guideline 405 (7) (kapitel B. 5 i dette bilag).
2. Formålet med denne testmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et teststofs potentielle øjenætsning eller stærke øjenirritation som målt ved dets evne til at inducere toksicitet i et enukleeret kyllingeøje. Toksiske virkninger på cornea måles ved (i) en kvalitativ vurdering af uklarhed, (ii) en kvalitativ vurdering af epitelbeskadigelse på grundlag af applikation af fluorescein på øjet (fluoresceinretention), (iii) en kvantitativ måling af øget tykkelse (opsvulmning) og (iv) en kvalitativ vurdering af makroskopisk morfologisk overfladebeskadigelse. Vurderingerne af cornea-uklarhed, -opsvulmning og -beskadigelse efter eksponering for et teststof evalueres individuelt, hvorefter de kombineres til udledning af en Eye Irritancy Classification (øjenirritationsklassificering).
3. Øjenirriterende stoffer, som inducerer læsioner, der forsvinder på mindre end 21 dage, og ikke-øjenirriterende stoffer er også testet ved anvendelse af ICE-testmetoden. ICE-testmetodens nøjagtighed og pålidelighed for stoffer i disse kategorier er imidlertid ikke vurderet formelt.
4. Definitioner findes i tillæg 1.

**INDLEDENDE BETRAGTNINGER OG BEGRÆNSNINGER**

5. Denne testmetode er baseret på Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ICE Test Method Protocol (8), som blev udviklet efter en international valideringsundersøgelse (4) (5) (9) med bidrag fra European Centre for the Validation of Alternative Methods, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods og TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederlandene). Protokollen er baseret på oplysninger fra offentliggjorte protokoller, såvel som TNO's aktuelt anvendte protokol (10) (11) (12) (13) (14).
6. De identificerede begrænsninger for denne metode er baseret på falsk positiv-raten for alkoholer og falsk negativ-raterne for faste stoffer og overfladeaktive stoffer (se punkt 47) (4). Når stoffer i disse kemiske og fysiske stofgrupper udelukkes fra databasen, forbedres ICE's nøjagtighed på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne væsentligt (4). Som følge af formålet med dette assay (dvs. alene identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer) er falsk negativ-rater ikke kritiske, eftersom sådanne stoffer efterfølgende vil blive testet hos kaniner eller med andre tilstrækkeligt validerede *in vitro*-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi med en »weight of evidence«-tilgang. Den nuværende valideringsdatabase har desuden ikke muliggjort en tilstrækkelig vurdering af visse kemiske stofgrupper eller produktgrupper (f.eks. blandinger). Undersøgerne vil imidlertid kunne overveje at anvende denne testmetode til test af alle materialetyper (herunder blandinger), hvor et positivt resultat vil kunne accepteres som indikativt for en øjenætsningsrespons eller svær øjenirritationsrespons. Positive resultater for alkoholer skal dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.
7. Alle procedurer med kyllingeøjne skal følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af humane eller animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (15).
8. Testmetoden har den begrænsning, at selv om den tager højde for nogle af de øjenvirkninger, som vurderes i kaninøjenirritationstestmetoden, og til en vis grad deres sværhedsgrad, tager den ikke højde for conjunctiva- og irisskader. Desuden kan reversibiliteten af cornealæsioner ikke vurderes i sig selv med ICE-testmetoden, men det er på grundlag af kaninøjenundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsiensdybde kan anvendes til at skelne mellem irreversible og reversible virkninger (16). Endelig muliggør ICE-testmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.
9. Der er bestræbelser i gang for yderligere at karakterisere anvendeligheden af og begrænsningerne for ICE-testmetoden til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (se også punkt 48). Brugere opfordres også til at forsyne valideringsorganisationer med prøver og/eller data med henblik på formel vurdering af mulige fremtidige anvendelser af ICE-testmetoden, herunder anvendelse til identifikation af ikke-stærkt øjenirriterende stoffer og ikke-øjenirriterende stoffer.



10. Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 2. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af ICE-testmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af ICE-data med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

#### PRINCIP FOR TESTMETODEN

11. ICE-testmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder kyllingeøjets funktion *in vitro*. Ved denne testmetode vurderes teststoffets beskadigende virkning ved bestemmelse af cornea-opsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention. Mens de to sidstnævnte parametre indebærer en kvalitativ vurdering, medfører analyse af cornea-opsvulmning, at der skal foretages en kvantitativ vurdering. Hver måling konverteres enten til en kvantitativ score, som anvendes til beregning af et samlet Irritation Index (irritationsindeks), eller tildeles en kvalitativ kategorisering, som anvendes til at tildele en *in vitro*-klassificering med hensyn til øjenætsning og stærk øjenirritation. Begge disse udfald kan derpå anvendes til at forudsige et teststofs *in vivo*-potentiale for øjenætsning og stærk øjenirritation (se Beslutningskriterier).

#### Kilde til kyllingeøjne og deres alder

12. Historisk set er der til dette assay anvendt øjne indsamlet fra kyllinger på et slagteri, hvor de aflives med henblik på anvendelse til konsum, hvilket eliminerer behovet for forsøgsdyr. Kun øjnene fra raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes.
13. Selv om der ikke er gennemført en kontrolleret undersøgelse til vurdering af den optimale kyllingealder, har de ved denne testmetode anvendte kyllinger historisk set haft samme alder og vægt som de på et fjerkræslagteri traditionelt behandlede våryllinger (dvs. ca. 7 uger gamle kyllinger med en vægt på 1,5-2,5 kg).

#### Indsamling og transport af øjne til laboratoriet

14. Hovederne skal fjernes umiddelbart efter sedering af kyllingerne, som sædvanligvis sker ved elektrisk stød, og incision i halsen med henblik på afblødning. Der skal findes en lokal kilde til kyllinger tæt på laboratoriet, således at deres hoveder kan overføres fra slagteriet til laboratoriet hurtigt nok til, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Tidsintervallet mellem indsamlingen af kyllingehovederne og anvendelsen af øjnene ved ICE-testmetoden skal minimeres (det skal typisk være to timer eller derunder), og det skal påvises, at intervallets varighed ikke påvirker assayresultaterne negativt. Disse resultater er baseret på udvælgelseskriterierne for øjnene såvel som de positive og negative kontrolresponsen. Alle de øjne, som anvendes i assayet, skal stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.
15. Eftersom øjnene fridissekeres i laboratoriet, transporteres de intakte hoveder fra slagteriet ved omgivende temperatur i plastkasser befuldt med håndklæder, som er vædet med isotonisk saltvand.

#### Udvælgelseskriterier for øjne, der anvendes i ICE-testen

16. Øjne med højt niveau af basislinjefluoresceinfarvning (dvs.  $> 0,5$ ) eller høj cornea-uklarhedsscore (dvs.  $> 0,5$ ) efter enukleering kasseres.
17. Hver behandlingsgruppe og samtidige positive kontrol består af mindst tre øjne. Den negative kontrolgruppe eller opløsningsmiddelkontrollen (hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end saltvand) består af mindst ét øje.

#### TESTPROCEDURE

##### Klargøring af øjnene

18. Øjenlågene ekscederes forsigtigt og uden at beskadige cornea. Der foretages en hurtig vurdering af cornea-integriteten ved at påføre en dråbe 2 % (vægt/volumen) natriumfluorescein på cornea-overfladen i nogle få sekunder, hvorefter der skylles med isotonisk saltvand. De fluoresceinbehandlede øjne undersøges derefter med et spaltelampemikroskop for at sikre, at cornea er ubeskadiget (dvs. har scorer for fluoresceinretention og cornea-uklarhed  $\leq 0,5$ ).
19. Er cornea ubeskadiget, fridissekeres øjet helt fra kraniet uden at beskadige cornea. Øjeæblet trækkes ud af øjenhulen ved et fast tag i blinkhinden med en kirurgisk tang, og øjenmusklerne skæres over med en bøjlet, stumpet saks. Det er vigtigt at undgå corneabeskadigelse som følge af overdrevent tryk (dvs. komprimeringsartefakter).
20. Når øjet fjernes fra øjenhulen, skal der medfølge en synlig vedhængende del af synsnerven. Efter fjernelsen fra øjenhulen anbringes øjet på et absorberende underlag, hvorefter blinkhinden og andet bindevæv skæres væk.

21. Det enukleerede øje anbringes i en rustfri stålholder med cornea i lodret position. Derefter indsættes holderen i et kammer i superfusionsapparatet (16). Holderne skal anbringes sådan i superfusionsapparatet, at det isotoniske saltvand drypper ned over hele cornea. Temperaturen i superfusionsapparatets kamre skal være reguleret til  $32 \pm 1,5$  °C. Tillæg 3 indeholder et diagram over et typisk superfusionsapparat og øjenholderne, som kan købes i handelen eller konstrueres. Apparatet kan modificeres, så det opfylder det enkelte laboratoriums behov (f.eks. så det kan rumme et andet antal øjne).
22. Efter anbringelsen i superfusionsapparatet undersøges øjnene igen med et spaltelampemikroskop for at sikre, at de ikke er blevet beskadiget under dissektionsproceduren. På dette tidspunkt måles også corneatykkelsen. Den måles ved corneas toppunkt ved anvendelse af dybdemålingsanordningen på spaltelampemikroskopet. Øjne med (i) en fluoresceinretentionsscore på  $> 0,5$ ; (ii) en cornea-uklarhed på  $> 0,5$  eller (iii) eventuelle yderligere tegn på beskadigelse skal udskiftes. Af de øjne, der ikke kasseres ud fra nogen af ovennævnte kriterier, kasseres øjne med en corneatykkelse, som afviger mere end 10 % fra gennemsnitsværdien for alle øjne. Brugere skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden. Spaltebredden skal indstilles til 0,095 mm.
23. Når alle øjnene er undersøgt og godkendt, inkuberes de i ca. 45 til 60 minutter for at bringe dem i ligevægt med testsystemet inden dosering. Efter ligevægtsindstillingsperioden foretages en nulpunktsreferencemåling af corneatykkelse og -uklarhed, som vil fungere som basislinje (dvs. tid = 0). Den ved fridissekering bestemte fluoresceinscore anvendes som basislinjemåling for det endepunkt.

#### Applikation af teststoffet

24. Umiddelbart efter nulpunktsreferencemålingerne fjernes øjet (i sin holder) fra superfusionsapparatet og anbringes i vandret position, hvorefter teststoffet påføres på cornea.
25. Flydende teststoffer testes typisk ufortyndede, men kan fortyndes, hvis det anses for nødvendigt (f.eks. som del af undersøgelsens design). Det foretrukne opløsningsmiddel til fortyndede stoffer er fysiologisk saltvand. Der kan imidlertid også anvendes alternative opløsningsmidler under kontrollerede betingelser, men egnetheden af andre opløsningsmidler end fysiologisk saltvand skal påvises.
26. Flydende teststoffer påføres på cornea således, at hele overfladen af cornea dækkes jævnt med teststoffet. Standardvolumenet er 0,03 ml.
27. Om muligt bør faste stoffer formales så fint som muligt med morter og støder eller et tilsvarende formalingsværktøj. Pulveret påføres på cornea således, at overfladen dækkes jævnt med teststoffet. Standardmængden er 0,03 g.
28. Når teststoffet (flydende eller fast) har været påført i 10 sekunder, skylles det væk fra øjet med isotonisk saltvand (ca. 20 ml) ved omgivende temperatur. Øjet (i sin holder) sættes derefter tilbage i superfusionsapparatet i sin oprindelige opretstående position.

#### Kontrolstoffer

29. Der skal indgå samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel/vehikel-kontroller og positive kontroller i hvert forsøg.
30. Ved test af væsker i en koncentration på 100 % eller faste stoffer anvendes fysiologisk saltvand som den samtidige negative kontrol ved ICE-testmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.
31. Ved test af fortyndede væsker medtages en samtidig opløsningsmiddel/vehikel-kontrolgruppe ved testmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons. Som anført i punkt 25 kan der kun anvendes et opløsningsmiddel/vehikel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt.

32. Der medtages et kendt øjenirriterende stof som samtidig positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere, at der induceres en passende respons. Eftersom ICE-assayet anvendes i denne testmetode til identifikation af ætsende eller stærkt irriterende stoffer, skal den positive kontrol være et referencestof, som inducerer en svær respons ved denne testmetode. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af den svære respons imidlertid ikke være overdrevent stor. Der skal genereres tilstrækkelige *in vitro*-data for den positive kontrol, således at der kan beregnes et statistisk defineret acceptabelt interval for den positive kontrol. Hvis der ikke er tilstrækkelige historiske ICE-testmetodedata tilgængelige for en bestemt positiv kontrol, kan det være nødvendigt at gennemføre undersøgelser for at tilvejebringe disse oplysninger.
33. Eksempler på positive kontroller for flydende teststoffer er 10 % eddikesyre eller 5 % benzalkoniumchlorid, mens eksempler på positive kontroller for faste teststoffer er natriumhydroxid eller imidazol.
34. Referencestoffer er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialer for ukendte kemikalier fra en særlig kemisk stofgruppe eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentialer for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponsen.

#### Målte endepunkter

35. Behandlede corneae vurderes inden behandlingen og fra og med 30, 75, 120, 180 og 240 minutter ( $\pm$  5 minutter) efter skyllingen efter behandlingen. Med disse tidspunkter opnås et passende antal målinger over firetimers behandlingsperioden, samtidig med at der er tilstrækkelig tid mellem målingerne til at foretage de fornødne observationer for alle øjnene.
36. De vurderede endepunkter er cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention og morfologiske virkninger på cornea (f.eks. erosion eller løsning af epitelet). Alle endepunkterne med undtagelse af fluoresceinretention (som kun bestemmes inden behandlingen og 30 minutter efter teststofeksposeringen) bestemmes på hvert af de ovennævnte tidspunkter.
37. Det tilrådes at tage fotografier for at dokumentere cornea-uklarhed og -fluoresceinretention, morfologiske virkninger på cornea og, hvis det udføres, histopatologi.
38. Efter den afsluttende undersøgelse efter fire timer opfordres brugerne til at konservere øjnene i et egnet fikseringsmiddel (f.eks. neutralbufret formalin) med henblik på eventuel histopatologisk undersøgelse.
39. Cornea-opsvulmning bestemmes ud fra corneatykkelsesmålinger foretaget med et optisk pachymeter på et spalte-lampemikroskop. Den udtrykkes i procent og beregnes ud fra corneatykkelsesmålinger ved hjælp af følgende formel:

$$\left( \frac{\text{cornea tykkelse til tiden } t - \text{cornea tykkelse til tiden } = 0}{\text{cornea tykkelse til tiden } = 0} \right) \times 100$$

40. Den gennemsnitlige procentvise cornea-opsvulmning for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-uklarhed som observeret på et hvilket som helst tidspunkt opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert teststof.
41. Beregningen af cornea-uklarhed baseres på scoring af det område af cornea, hvor uklarheden er mest udtalt. Den gennemsnitlige cornea-uklarhedsværdi for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-uklarhed som observeret på et hvilket som helst tidspunkt opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert teststof (tabel 1).

Tabel 1

Cornea-uklarhedsscorer

Score	Observation
0	Ingen uklarhed
0,5	Meget ubetydelig uklarhed

Score	Observation
1	Spredte eller diffuse områder; detaljer i iris ses tydeligt
2	Let skelneligt gennemskinneligt område; detaljer i iris er lidt utydelige
3	Stærk cornea-uklarhed; ingen specifikke detaljer i iris er synlige; pupillens størrelse er kun lige akkurat skelnelig
4	Fuldstændig cornea-uklarhed; iris er ikke synlig

42. Den gennemsnitlige fluoresceinretentionsværdi for alle testøjnene beregnes kun for 30-minutters observationstidspunktet, og herudfra opnås den samlede kategoriscore for hvert teststof (tabel 2).

Tabel 2

## Fluoresceinretentionsscorer

Score	Observation
0	Ingen fluoresceinretention
0,5	Meget ubetydelig enkeltcellefärvning
1	Enkeltcellefärvning spredt ud over hele det behandlede område af cornea
2	Fokal eller sammenflydende enkeltcellefärvning med høj tæthed
3	Fluorescein er tilbageholdt i store sammenflydende områder af cornea

43. Morfologiske virkninger omfatter »erosion« af cornea-epitelceller, »løsning« af epitelet, »tiltagende ruhed« af cornea-overfladen og »fastklæben« af teststoffet til cornea. Disse resultater kan have varierende sværhedsgrad og kan forekomme samtidig. Klassificeringen af disse resultater er subjektiv og baseret på undersøgerens fortolkning.

## DATA OG RAPPORTERING

## Datavurdering

44. Resultaterne for cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention skal vurderes særskilt for at finde frem til en ICE-stofgruppe for hvert endepunkt. Derefter kombineres ICE-stofgrupperne for hvert endepunkt for at opnå en Irritancy Classification (irritationsklassificering) for hvert teststof.

## Beslutningskriterier

45. Når hvert af endepunkterne er vurderet, kan der fastsættes ICE-stofgrupper på grundlag af forudfastsatte intervaller. Fortolkning af corneatykkelse (tabel 3), -uklarhed (tabel 4) og -fluoresceinretention (tabel 5) ved anvendelse af fire ICE-stofgrupper udføres ud fra følgende skalaer:

Tabel 3

## ICE-klassificeringskriterier for corneatykkelse

Gennemsnitlig cornea-opsvulmning (%) (*)	ICE-stofgruppe
0-5	I
> 5-12	II
> 12-18 (> 75 min efter behandling)	II
> 12-18 (≤ 75 min efter behandling)	III
> 18-26	III

Gennemsnitlig cornea-opsvulmning (%) (*)	ICE-stofgruppe
> 26-32 (> 75 min efter behandling)	III
> 26-32 (≤ 75 min efter behandling)	IV
> 32	IV

(\*) Cornea-opsvulmningsscorerne gælder kun, hvis tykkelsen er målt med et Haag-Streit BP900-spaltelampemikroskop med dybde-målingsanordning nr. I og indstilling af spaltebredden til 9½, som svarer til 0,095 mm. Brugere skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden.

Tabel 4

## ICE-klassificeringskriterier for uklarhed

Gennemsnitlig maksimal uklarhedsscore (*)	ICE-stofgruppe
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(\*) Se tabel 1.

Tabel 5

## ICE-klassificeringskriterier for gennemsnitlig fluoresceinretention

Gennemsnitlig fluoresceinretentionsscore 30 minutter efter behandling (*)	ICE-stofgruppe
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(\*) Se tabel 2.

46. Den samlede *in vitro*-irritationsklassificering for et teststof fastsættes ved at aflæse den irritationsklassificering, der svarer til kombinationen af kategorier opnået for cornea-opsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention, og gå ud fra oversigten i tabel 6.

Tabel 6

Samlede *in vitro*-irritationsklassificeringer

Klassificering	Kombinationer af de 3 endepunkter
Ætsende stof/Stærkt irriterende stof	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Cornea-uklarhed ≥ 3 efter 30 min (for mindst 2 øjne) Cornea-uklarhed = 4 på et hvilket som helst tidspunkt (for mindst 2 øjne) Markant løsning af epitelet (for mindst 1 øje)

(\*) Disse kombinationer er mindre sandsynlige.

47. Som anført i punkt 1 skal der, hvis teststoffet ikke identificeres som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof, gennemføres yderligere testning med henblik på klassificering og mærkning. ICE-testmetoden har en generel nøjagtighed på 83 % (120/144) til 87 % (134/154), en falsk positiv-rate på 6 % (7/122) til 8 % (9/116) og en falsk negativ-rate på 41 % (13/32) til 50 % (15/30) til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer i sammenligning med *in vivo*-kaninøjentestmetodedata klassificeret i henhold til EPA- (1), EU- (2) eller GHS- (3) klassificeringssystemerne. Når stoffer i visse kemiske (dvs. alkoholer og overfladeaktive stoffer) og fysiske (dvs. faste stoffer) stofgrupper udelukkes fra databasen, ligger nøjagtigheden af ICE på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne fra 91 % (75/82) til 92 % (69/75), falsk positiv-raterne ligger fra 5 % (4/73) til 6 % (4/70), og falsk negativ-raterne ligger fra 29 % (2/7) til 33 % (3/9) (4).
48. Selv hvis der ikke opnås en klassificering som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof for et teststof, kan ICE-dataene være nyttige sammen med testdata fra *in vivo*-kaninøjentesten eller fra en tilstrækkeligt valideret *in vitro*-test til yderligere vurdering af anvendeligheden af og begrænsningerne for ICE-testmetoden til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (et Guidance Document om anvendelse af *in vitro*-øjentoksicitets-testmetoder er under udarbejdelse).

### Undersøgelsesacceptkriterier

49. En test betragtes som acceptabel, hvis de samtidige negative kontroller eller vehikel/opløsningsmiddel-kontroller og de samtidige positive kontroller giver en Irritancy Classification (irritationsklassificering) inden for henholdsvis ikke-irriterende og stærkt irriterende/ætsende stofgrupper.

### Testrapport

50. Testrapporten skal omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

#### *Test- og kontrolstoffer*

Kemisk(e) navn(e), såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes;

CAS-registreringsnummeret (RN), hvis det kendes;

renhed og sammensætning af stoffet eller blandingen (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige;

fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemisk stofgruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse;

behandling af test/kontrol-stofferne inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling);

stabilitet, hvis den kendes.

#### *Oplysninger om sponsoren og testfaciliteten*

Navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen;

identifikation af kilden til øjnene (f.eks. den facilitet, hvor de er indsamlet);

opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for øjenindsamling, tidsinterval inden påbegyndelse af testning);

særlige karakteristika ved de dyr, som øjnene er indsamlet fra (f.eks. donordyrenes alder, køn, vægt), hvis de er tilgængelige.

#### *Begrundelse for den anvendte testmetode og protokol*

##### *Testmetodeintegritet*

Den procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af testmetoden over tid (f.eks. periodisk testning af kompetencestoffer, anvendelse af historiske negative og positive kontrolldata).



*Kriterier for en acceptabel test*

acceptable samtidige referencekontrolintervaller på grundlag af historiske data, hvis det er relevant.

*Testbetingelser*

Beskrivelse af det anvendte testsystem;

det anvendte spaltelampemikroskop (f.eks. modellen);

instrumentindstillinger for det anvendte spaltelampemikroskop;

oplysninger om de anvendte kyllingeøjne, herunder specifikation af deres kvalitet;

detaljer om den anvendte testprocedure;

anvendt(e) teststofkoncentration(er);

beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren;

reference til historiske data for modellen (f.eks. negative og positive kontroller, kompetencestoffer, referencestoffer);

beskrivelse af de anvendte vurderingskriterier.

*Resultater*

Beskrivelse af andre observerede virkninger.

Fotografier af øjnene, hvis det er relevant.

*Diskussion af resultaterne**Konklusion**LITTERATUR*

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EØS-relevant tekst). EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York & Geneva, 2007. Se følgende websted:  
  
[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)].
- (4) 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 Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
- (5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Erklæring om konklusionen på den retrospektive ICCVAM-undersøgelse af organotypiske *in vitro*-assays som screeningstest til identifikation af potentielle øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer). Se følgende websted:  
  
[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (6) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF. EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Se følgende websted:
- [[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)].
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. I: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
- (9) ICCVAM (2006). 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. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](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) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Se følgende websted:
- [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (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) 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. Se følgende websted:
- [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- (16) 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.
- (17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
- (18) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].
- (19) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Se følgende websted:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].

## Tillæg 1

## DEFINITIONER

**Cornea:** Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

**Cornea-opsvulmning:** En objektiv måling i ICE-testen af graden af cornea-udvidelse efter eksponering for et teststof. Den udtrykkes i procent og beregnes ud fra corneatykkelsesmålinger ved basislinje (inden dosering) og tykkelsen registreret med regelmæssige intervaller efter eksponering for testmaterialet i ICE-testen. Graden af cornea-opsvulmning er indikativ for beskadigelse af cornea.

**Cornea-uklarhed:** Måling af graden af cornea-ugennemsigtighed efter eksponering for et teststof. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea.

**EPA-kategori I:** Ætsende virkning (irreversibel ødelæggelse af øjenvæv) eller corneabeskadigelse eller -irritation, som persisterer mere end 21 dage (1).

**EU-kategori R41:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (2).

**Falsk negativ-rate:** Den andel af alle positive stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**Falsk positiv-rate:** Den andel af alle negative stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**Fluoresceinretention:** En subjektiv måling i ICE-testen af det omfang, hvori natriumfluorescein tilbageholdes af epitelceller i cornea efter eksponering for et teststof. Graden af fluoresceinretention er indikativ for beskadigelse af cornea-epitelet.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals [det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier]):** Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer, såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om stoffernes og blandingeres skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (3).

**GHS-kategori 1:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsettelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (3).

**Ikke-irriterende stof:** Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori I, II eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B (1) (2) (3).

**Negativ kontrol:** Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Denne prøve behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastslå, om opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

**Nøjagtighed:** Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til.

**Opløsningsmiddel/vehikel-kontrol:** En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller vehiklet, og som behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basislinjerresponsen for de prøver, som er behandlet med teststoffet opløst i det samme opløsningsmiddel eller vehikel. Ved test sammen med en samtidig negativ kontrol påviser denne prøve også, hvorvidt opløsningsmidlet eller vehiklet interagerer med testsystemet.

**Positiv kontrol:** Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af den svære respons ikke være overdrevent stor.

**Potentiel fare:** Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

**Pålidelighed:** Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

**Referencestof:** Et stof, som anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: (i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; (ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; (iii) kendte fysiske/kemiske egenskaber; (iv) støttedata om kendte virkninger og (v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

**Spaltelampemikroskop:** Et instrument, som anvendes til direkte undersøgelse af øjet under forstørrelse tilvejebragt af et binokulært mikroskop ved frembringelse af et stereoskopisk, retvendt billede. Ved ICE-testmetoden anvendes dette instrument til at betragte de anteriore strukturer i kyllingeøjlet såvel som til objektiv måling af corneatykkelse med et dybdemålingsanordningstilbehør.

**Stærkt øjenirriterende stof:** (a) Et stof, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade, som ikke er reversibel inden for 21 dage efter applikation, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

**Trindeltestning:** Ved anvendelse af den trindelte testningsstrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et teststof i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en »weight of evidence«-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et teststofs irritationspotentiale kan fastslås på grundlag af de eksisterende oplysninger, er der ikke behov for yderligere testning. Hvis et teststofs irritationspotentiale ikke kan fastsættes på grundlag af de eksisterende oplysninger, udføres en trinvis sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

**Valideret testmetode:** En testmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret testmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

**»Weight of evidence«:** En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

**Øjenirriterende stof:** (a) Et stof, der frembringer en reversibel ændring i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

**Øjenætsende stof:** (a) Et stof, der forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

## Tillæg 2

## KOMPETENCEKEMIKALIER TIL ICE-TESTMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af en testmetode, der følger denne testmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenætsningsklassificeringen for de ti anbefalede stoffer i tabel 1. Disse stoffer er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for lokal øjen-irritation/ætsning, som er baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (TG 405) (dvs. stoffer, der i henhold til UN GHS er i kategori 1, 2A, 2B eller ikke er klassificeret og mærket) (3) (7). Hvad angår den validerede anvendelighed af disse assays (dvs. alene til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer), er der imidlertid kun to testudfald i relation til klassificering (ætsende stof/stærkt irriterende stof eller ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof), hvormed kompetencen kan godtgøres. Andre udvælgelseskriterier var, at stofferne er kommercielt tilgængelige, at der er tilgængelige *in vivo*-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for de to *in vitro*-metoder, for hvilke der er Test Guidelines under udarbejdelse. Derfor blev irriterende stoffer udvalgt fra den af ICCVAM anbefalede liste over 122 referencestoffer til validering af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder (se Appendix H, ICCVAM Recommended Reference Substances List) (4). Referencedata findes i ICCVAM Background Review Documents for oksecornea-uklarheds- og -permeabilitetstestmetoden (BCOP [Bovine Corneal Opacity and Permeability]-testmetoden) og ICE-testmetoden (18) (19).

Tabel 1

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af ICE

Kemikalium	CASRN	Kemisk stofgruppe <sup>(1)</sup>	Fysisk form	<i>In vivo</i> -klassificering <sup>(2)</sup>	<i>In vitro</i> -klassificering <sup>(3)</sup>
Benzalkonium chlorid (5 %)	8001-54-5	Onium forbindelse	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Dibenzoyl-L-vinsyre	2743-38-6	Carboxylsyre, ester	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk	Fast	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
Trichloreddike syre (30 %)	76-03-9	Carboxylsyre	Flydende	Kategori 1	Ætsende stof/stærkt irriterende stof
2,6-dichlor-benzoyl-chlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Flydende	Kategori 2A	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ethyl-2-methylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Flydende	Kategori 2B	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Ammonium nitrat	6484-52-2	Uorganisk salt	Fast	Kategori 2A	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Flydende	Ikke mærket	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof
n-hexan	110-54-3	Carbonhydrid (acyklisk)	Flydende	Ikke mærket	Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

<sup>(1)</sup> De kemiske stofgrupper for hvert teststof blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(2)</sup> Baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (OECD TG 405) og brug af UN GHS (3) (7).

<sup>(3)</sup> Baseret på resultater fra BCOP og ICE.

Tillæg 3

Diagrammer over ICE-superfusionsapparatet og øjenholderne

(Se Burton et al. (17) for yderligere generiske beskrivelser af superfusionsapparatet og øjenholderen)

