

**KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr 1152/2010,****8. detsember 2010,****millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määrust (EÜ) nr 440/2008, millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)****(EMPs kohaldatav tekst)**

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrust (EÜ) nr 1907/2006 (mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaalamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ),<sup>(1)</sup> eriti selle artikli 13 lõiget 3,

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjoni määrmus (EÜ) nr 440/2008<sup>(2)</sup> on esitatud katsemeetodid ainete füüsikalise-keemiliste omaduste, toksilisuse ja ökotoksilisuse määramiseks, mida kasutatakse määruse (EÜ) nr 1907/2006 kohaldamisel.
- (2) On vaja ajakohastada määrust (EÜ) nr 440/2008, et lisada prioriteetsena kaks uut, OECD poolt hiljuti heaks kiidetud *in vitro*-katsemeetodid silmaärrituse määramiseks, et vähendada katsetes kasutatavate loomade arvu miini-

mumini vastavalt nõukogu 24. novembri 1986. aasta direktiivile 86/609/EMÜ katseteks ja muudel teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitsega seotud liikmesriikide õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta<sup>(3)</sup>. Käesoleva eelnõuga seoses on konsulteeritud sidusrühmadega.

- (3) Seepärast tuleks määrust (EÜ) nr 440/2008 vastavalt muuta.
- (4) Käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas määruse (EÜ) nr 1907/2006 artikli 133 kohaselt asutatud komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

*Artikkel 1*

Määruse 440/2008 lisa B osasse lisatakse peatükid B.47 ja B.48 käesoleva määruse lisas esitatud kujul.

*Artikkel 2*

Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 8. detsember 2010

Komisjoni nimel

president

José Manuel BARROSO

<sup>(1)</sup> ELT L 396, 30.12.2006, lk 1.

<sup>(2)</sup> ELT L 142, 31.5.2008, lk 1.

<sup>(3)</sup> EÜT L 358, 18.12.1986, lk 1.

## LISA

**„B.47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SILMA SÖÖVITAVATE JA TUGEVASTI ÄRRITAVATE AINETE KINDLAKSTEGEMISEKS**

## SISSEJUHATUS

1. Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse katse (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* – BCOP) on *in vitro*-katsemeetod, mida võib teatavatel asjaoludel ja teatavate piirangutega kasutada, et klassifitseerida aineid ja segusid silma söövitavaks ja tugevasti ärritavaks (1), (2), (3). Käesoleva katsemeetodi puhul määratletakse tugevasti ärritava toimega aineks või seguks sellised, mis tekitavad küülikul pärast pealekandmist vähemalt 21 päeva püsiva silmakahjustuse. Katsemeetodit ei peeta küüliku silma *in vivo*-katse täieliku asendamise jaoks kõlblikuks; BCOP-meetodit soovitatakse kasutada astmelise katsetamise strateegia osana õigusliku klassifitseerimise ja märgistamise jaoks konkreetsetes kasutusvaldkonnas (4), (5). Uuritavad ained ja segud (6) võib klassifitseerida silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks ilma edasise katsetamiseta küülikutel. Negatiivse tulemuse andnud ainet on vaja katsetada küülikul, kasutades järjestikuste katsete strateegiat, mis on esitatud OECD katsesuunises 405 (7) (käesoleva lisa B.5 peatükk).
2. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada menetlusi, mida kasutatakse uuritava aine silma söövitava või tugevasti ärritava toime hindamiseks, tuginedes aine omadusele põhjustada veise isoleeritud sarvkesta hägustumist ja suurendada selle läbilaskvust. Toksilist mõju sarvkestale mõõdetakse: i) valguse läbilaskvuse vähenemise (hägususe tekke) ja ii) naatriumfluorestseini läbilaskvuse suurenemise järgi. Uuritava aine klassifitseerimiseks silma ärritava toime järgi kasutatakse nn *in vitro*-ärritavuse hinnet (*In Vitro Irritancy Score*, IVIS), mille arvutamiseks kombineeritakse pärast uuritava ainega kokkupuudet toimunud sarvkesta hägustumise ja läbilaskvuse suurenemise hinnangud.
3. BCOP-meetodiga on uuritud ka silmärritajaid, mille tekitatud kahjustused paranevad vähem kui 21 päevaga, samuti aineid, mis silmi ei ärrita. Kuid sellistesse kategooriatesse kuuluvate ainete puhul ei ole BCOP-meetodi täpsust ja usaldusväärsust ametlikult hinnatud.
4. Mõisted on esitatud 1. liites.

## ALGSED KAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Käesolev katsemeetod põhineb alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) BCOP-meetodi eeskirjal (8), mis töötati välja rahvusvahelise valideerimisuringu alusel (4), (5), (9), millesse andsid oma panuse alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (JaCVAM). Eeskiri põhineb *In Vitro* Teaduste Instituudis (IIVS) saadud tabel ja INVITTOXi eeskirjal 124 (10), mida kasutati Euroopa Ühenduse rahastatud BCOP-meetodi eelvalideerimisuringus 1997–1998. Mõlemad eeskirjad põhinevad BCOP-katse eeskirjal, mille esimesena avaldasid Gautheron ja kaasautorid (11).
6. Käesoleva katsemeetodi puhul kindlaks tehtud piirangud on seotud valepositiivsete tulemuste kõrge osakaaluga alkoholide ja ketoonide puhul ning valenegatiivsete tulemuste kõrge osakaaluga tahkete ainete puhul, mida täheldati valideerimisandmebaasi puhul (vt punkt 44) (5). Kui osutatud kemikaaliklassidesse ja füüsikalistesse aineklassidesse kuuluvad ained andmebaasist välja jätta, suureneb BCOP-meetodi täpsus ELi ja USA keskkonnaameti (EPA) klassifitseerimissüsteemi ning ka ülemaailmselt ühtlustatud klassifitseerimissüsteemi (GHS) järgi oluliselt (5). Pidades silmas kõnealuse katse eesmärki (teha üksnes kindlaks silmi söövitavad või tugevasti ärritavad ained), ei ole valenegatiivsed tulemused väga olulised, kuna selliseid aineid uuritakse reguleerivate asutuste nõuetest olenevalt edasi küülikutel või muudes korralikult valideeritud *in vitro*-katsetes, kasutades järjestikuste katsete strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi. Lisaks ei võimaldanud senine valideerimisandmebaas õigesti hinnata mõnesid kemikaali- või tooteklasse (näiteks segusid). Kuid teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist kõigi uuritava materjali tüüpide, kaasa arvatud segude puhul, kusjuures positiivse tulemuse võiks lugeda tõendiks, et tegemist on silma söövitava või tugevasti ärritava toimega. Alkoholide ja ketoonidega saadud positiivseid tulemusi tuleks võtta ettevaatusega, kuna nende puhul on oht mõju ülehinnata.
7. Veiste silmade ja sarvkestadega tehtavate toimingute puhul tuleks alati järgida katselaboris kohaldatavaid loomadelt saadud materjalide, kaasa arvatud kudede ja koevedelike jne käsitlemise eeskirju ja korda. Soovitatakse kasutada üldisi laborite ettevaatusmeetmeid (12).
8. Katsemeetodi kasutatavust piirab asjaolu, et kuigi selle puhul võetakse arvesse mõnesid silmaga seotud mõjusid, mida on hinnatud küüliku silma ärritavuse katse, ja mingil määral ka mõjude tugevust, ei peegelda katse silma sidekesta ja vikerkesta kahjustusi. Kuigi BCOP-katsega ei saa põhimõtteliselt hinnata sarvkestakahjustuste pöördumust, on küüliku silma uuringute alusel soovitatud kasutada sarvkestakahjustuse esialgset sügavust pöördumatu ja pöörduva mõju eristamiseks (13). Lõpuks ei võimalda BCOP-katse hinnata ainete silmasattumisega kaasneva süsteemse toksilisuse võimalust.

9. Jätkatakse uuringuid BCOP-katse kasulikkuse ja piirangute edasiseks iseloomustamiseks ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (vt ka punkt 45). Meetodi kasutajatel palutakse valideerimisorganisatsioonidele saata näidiseid ja/või andmeid, et ametlikult hinnata BCOP-katse võimalikku muud tulevast kasutust, sealhulgas ka ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet.
10. Iga labor, kes alustab katsemeetodi kasutamist, peaks oma taseme kontrollimiseks kasutama 2. liites esitatud kemikaale. Labor võib osutatud kemikaale kasutada selleks, et tõendada oma tehnilist pädevust BCOP-katse läbiviimisel, enne kui ta esitab BCOP-katsega saadud andmed regulatiivseks ohu klassifitseerimiseks.

#### KATSE PÕHIMÕTE

11. BCOP-meetod on organotüüpne mudel, mille abil on lühiajaliselt võimalik *in vitro* säilitada veise sarvkesta normaalseid füsioloogilisi ja biokeemilisi funktsioone. Katsemeetodis hinnatakse uuritava aine põhjustatud kahjustust sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse muutuste mõõtmisega hägususemõõtja ja nähtava valguse spektromeetri abil. Nende kahe mõõdetud suuruse järgi arvutatakse IVIS, mille alusel uuritavale ainele omistatakse *in vitro* määratud ärritavuse klassifikatsioonikategooria, et ennustada aine võimet ärritada silma *in vivo* (vt otsustamise kriteeriumid).
12. BCOP-meetodi puhul kasutatakse värskest tapetud veise silmast eraldatud sarvkesta. Sarvkesta hägusust mõõdetakse sarvkesta läbinud valgushulga mõõtmisega. Läbilaskvuse mõõtmiseks mõõdetakse värvaine naatriumfluorestseini kogus, mis on läbinud kogu sarvkesta paksuse ja jõudnud sarvkestataguses kambri olevasse lahusesse. Uuritavad ained kantakse sarvkesta epiteliaalsele pinnale sel teel, et need lisatakse sarvkestahoidja eespoolsesse kambri. 3. liites on esitatud BCOP-katses kasutatava sarvkestahoidja kirjeldus ja skeem. Sarvkestahoidjaid võib osta mitmelt firmalt või ehitada ise.

#### Veisesilmade hankimise allikad, kasutatavate loomade vanus ja valimine

13. Tapamaja saadetakse loomad tapetakse harilikult kas inimtoitudeks või muul kaubanduslikul eesmärgil. BCOP-katseks sobib üksnes sarvest, mis on võetud tervelt loomalt, keda peetakse sobivaks inimtoitude kasutamiseks. Kuna tapetavad loomad on tõust, vanusest ja soost olenevalt väga erineva kaaluga, ei ole looma soovitatavat kaalu tapmise ajal määratud.
14. Eri vanuses loomade silmade kasutamise korral võivad sarvkesta mõõtmed olla erinevad. Sarvestad, mille horisontaalläbimõõt on üle 30,5 mm ja paksus keskosas vähemalt 1 100 µm, saadakse tavaliselt üle kaheksa aasta vanustelt loomadelt, samas kui sarvestad horisontaalläbimõõduga alla 28,5 mm ja paksusega keskosas alla 900 µm saadakse tavaliselt loomadelt, kelle vanus on alla viie aasta (14). Seepärast kasutatakse tavaliselt silmi, mis on saadud kuni 60 kuu vanustelt loomadelt. Alla 12 kuu vanuste loomade silmi ei ole tavaliselt kasutatud, kuna selliste loomade silmad alles arenevad ning sarvkesta paksus ja läbimõõt on oluliselt väiksemad kui täiskasvanud loomade silmades. Noorte loomade (vanus 6–12 kuud) sarvestade kasutamine on siiski lubatud, kuna neil on ka eelseid, nagu parem kättesaadavus, kitsas vanusevahemik ja väiksem oht, et töötajad võivad kokku puutuda veiste spongiformse entsefalopaatia (15). Kuna oleks kasulik hinnata söövitavate või ärritavate ühendite suhtes avalduva sarvkesta tundlikkuse sõltuvust sarvkesta suurusest või paksusest, palutakse kasutajatel teatada, millises vanuses või millise kaaluga loomadelt pärinesid uuringus kasutatud sarvestad.

#### Silmade kogumine ja toimetamine laborisse

15. Silmad kogutakse tapamaja töötajate poolt. Mehaaniliste ja muude kahjustuste miinimumini viimiseks tuleks silmad silmakoopast eemaldada võimalikult kiiresti pärast looma surma. Et vältida silmade kokkupuudet ärritust põhjustavate ainetega, ei tohiks tapamaja töötajad looma pea loputamisel kasutada detergente.
16. Silmad tuleks paigutada sobiva suurusega anumasse nii, et need oleksid üleni kaetud Hanksi tasakaalustatud soolalahusega (*Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), ja toimetada laborisse viisil, mille puhul nende kahjustuse või bakteriaalsete saastuse oht oleks minimaalne. Kuna silmi kogutakse tapmisprotsessi ajal, võivad need kokku puutuda vere ja muude bioloogiliste ainetega, sealhulgas bakterite ja muude mikroorganismidega. Seepärast on oluline viia saastuse oht miinimumini (näiteks silmi sisaldava anuma hoidmisega jää peal ning silmade säilitamiseks ja transportimiseks kasutatavale Hanksi lahusele antibiootikumide lisamisega (näiteks 100 RÜ/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomüt-siini)).
17. Ajavahemik silmade kogumise ja sarvestade BCOP-katses kasutamise vahel peaks olema võimalikult lühike (tavaliselt kogutakse ja kasutatakse samal päeval), kusjuures tuleks tõendada, et katsetulemused ei sõltu konkreetsest ajavahemikust. Tulemuste aluseks on silmade valimise kriteeriumid ning positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes saadud tulemused. Kõik katses kasutatud silmad peavad pärinema ühest ja samast silmade rühmast, mis on kogutud ühel konkreetsel päeval.

**BCOP-katses kasutatavate silmade valimise kriteeriumid**

18. Silmi kontrollitakse peale laborisse saabumist hoolikalt, et neil ei esineks defekte, sealhulgas suurenenud hägusust, kriimustusi ja neovaskularisatsiooni. Kasutatakse ainult sellistest silmadest pärit sarvkesti, milles osutatud defekte ei ole.
19. Iga sarvkesta kvaliteeti hinnatakse ka katse hilisematel etappidel. Katses ei kasutata sarvkesti, mille hägusust pärast esialgset ühetunnist tasakaalustumist on üle 7 hägususühiku (märkus: hägusumõõtja kalibreeritakse hägusustandarditega, mida kasutatakse hägususühikute määramiseks, vt 3. liide).
20. Igas katserühmas (uuritav aine, sellega paralleelselt läbiviidavad positiivse ja negatiivse kontrolli katsed) kasutatakse vähemalt kolme silma. BCOP-katses kasutatakse negatiivse kontrolli katses kolme sarvkesta. Kuna kõik sarvkestad eemaldatakse tervelt silmamunalt ja paigutatakse sarvestakambrisse, võivad üksiku sarvkesta, sealhulgas negatiivse kontrolli katses kasutatud sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse väärtusi mõjutada käsitsemisest tekkinud artefaktid. Lisaks kasutatakse negatiivse kontrolli katses saadud hägususe ja läbilaskvuse väärtusi *in vitro*-ärritavuse hinnet (IVIS) arvutamisel uuritava ainega ja positiivse kontrolli katsetes saadud vastavate väärtuste parandamiseks.

**KATSE KÄIK****Silmade ettevalmistamine**

21. Defektidest vabad sarvkestad lõigatakse välja koos 2–3 mm laiuse kõvakestaäärega, mis hõlbustab edasist käsitsemist, kusjuures tuleb vältida sarvkesta epiteeli ja endoteeli kahjustamist. Isoleeritud sarvest kinnitatakse spetsiaalsesse sarvestahoidjasse, millel on eespoolne kamber – selle poole on sarvkesta epiteliaalne külg –, ja tagapoolne kamber, mille poole on endotelialne külg. Mõlemad kambrid täidetakse kuni ülevoolamiseni eelsoojendatud EMEM-lahusega (*Eagle's Minimum Essential Medium*), alustades tagapoolsest kambrist ja hoolitsedes, et kambris ei tekiks mulle. Seadet tasakaalustatakse seejärel temperatuuril  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  vähemalt üks tund, et sarvest saavutaks tasakaalu ümbritseva keskkonnaga ja saavutaks normaalse metaboolse aktiivsuse (sarvkesta pinna ligikaudne temperatuur *in vivo* on  $32^\circ\text{C}$ ).
22. Pärast tasakaalustumisperioodi lisatakse mõlemasse kambrisse värsket eelsoojendatud EMEM-lahust ja registreeritakse iga sarvkesta hägususe nullväärtus. Sarvkestad, millel on makroskoopilisi koekahjustusi (näiteks kriimustused, pigmentatsioon, neovaskularisatsioon) või mille hägusust on suurem kui 7 hägususühikut, jäetakse kõrvale. Arvutatakse kõigi tasakaalustatud sarvkestade keskmine hägusust. Negatiivse (või lahusti-) kontrolli katseteks valitakse vähemalt kolm sarvkesta, mille hägususe väärtused on kõigi sarvkestade hägususe keskväärtuse lähedal. Ülejäänud sarvkestad jagatakse seejärel kahte rühma: uuritava ainega töödeldavad ja positiivse kontrolli katse sarvkestad.
23. Kuna vee soojusmahtuvus on suurem kui õhul, on inkubeerimise ajal võimalik veega saavutada püsivamaid temperatuuritingimusi. Seepärast soovatakse täidetud sarvestahoidjate termostateerimiseks temperatuuril  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  kasutada vesivanni. Kuid kasutada võib ka õhktermostaate, võttes vajalikud meetmed temperatuuri stabiilsuse tagamiseks (näiteks hoidjate ja lahuste eelsoojendamine).

**Uuritava aine pealekandmine**

24. Kasutatakse kaht pealekandmismeetodit, millest üks on vedelike ja (tahkete või vedelate) pindaktiivsete ainete jaoks ning teine on selliste tahkete ainete jaoks, millel ei ole pindaktiivseid omadusi.
25. Vedelikke katsetatakse lahjendamata kujul ning pindaktiivseid aineid katsetatakse kontsentratsioonis 10 massiprotsenti 0,9 % naatriumkloriidi lahuses, destilleeritud vees või muus lahustis, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda kahjustavat mõju katsesüsteemile. Püdelaid aineid, kreeme ja vahasid uuritakse tavaliselt nagu vedelikke. Muu lahjenduskontsentratsiooni kasutamist tuleb veenvalt põhjendada. Sarvestal lastakse vedelike ja pindaktiivsete ainetega kokku puutuda 10 minutit. Muu kokkupuuteaja kasutamise korral tuleb esitada veenev teaduslik põhjendus.
26. Tahkeid aineid, millel ei ole pindaktiivseid omadusi, katsetatakse lahuse või suspensioonina kontsentratsioonis 20 massiprotsenti 0,9 % naatriumkloriidi lahuses, destilleeritud vees või muus lahustis, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda kahjustavat mõju katsesüsteemile. Teatavatel puhkudel ja veenva teadusliku põhjendusega võib tahkeid aineid katsetada ka puhtal kujul, kus uuritav aine kantakse otse sarvkesta pinnale, kasutades lahitse kambri meetodit (vt punkt 29). Sarvest jäetakse tahke ainega kokkupuutesse neljaks tunniks, kuid nagu vedelike ja pindaktiivsete ainete puhulgi võib veenva teadusliku põhjendusega kasutada ka muid kokkupuuteaegu.
27. Pealekandmiseks võib kasutada mitmesuguseid meetodeid, olenevalt uuritava aine füüsikalisest olekust ja keemilistest omadustest (näiteks tahke aine, vedelik, viskoosne või mitteviskoosne vedelik). Oluline on tagada, et uuritav aine korralikult kataks epiteliaalse pinna ja täielikult eemaldataks loputamisega. Mitteviskoosse või väheviskoosse uuritava vedeliku puhul kasutatakse tavaliselt suletud kambri meetodit; poolviskoosse ja viskoosse vedeliku või tahke puhta aine uurimiseks kasutatakse tavaliselt lahitse kambri meetodit.

28. Suletud kambri meetodi kasutamise korral viiakse eespoolseesse kambri ülaosas asuvate pealekandmisavade kaudu piisav kogus uuritavat ainet (750 µl), et see kataks sarvkesta epiteeliaalse külje; seejärel avad suletakse kokkupuuteajaks korkidega. Oluline on tagada, et iga sarvkest oleks uuritava ainega kokkupuutes vajaliku ajavahemiku jooksul.
29. Lahtise kambri meetodi kasutamisel võetakse eespoolse kambri akent hoidev rõngas ja klaasaken enne pealekandmist ära. Kontrollaine või uuritav aine (750 µl või sarvkesta täielikuks katmiseks piisav kogus) kantakse mikropipetiga otse sarvkesta epiteeliaalsele pinnale. Kui uuritavat ainet on raske pipeteerida, võib pealekandmise hõlbustamiseks viia uuritava aine surve all kolbpipetti. Kolbpipeti otsik viiakse tihedalt süstla dosaatorotsikusse, nii et ainet saab rõhu all viia kolbpipeti otsikusse. Samaaegselt pipetikolvi tagasitõmbamisega lastakse süstla kolb vabaks. Kui pipetiotsikusse ilmuvad õhumullid, surutakse uuritav aine välja ja võtet korratakse, kuni otsik on täidetud ja selles ei ole õhumulle. Vajaduse korral võib kasutada tavalist (ilma nõelata) süstalt, kuna sellega saab uuritava aine ruumala täpselt mõõta, samuti on sellega võimalik ainet hõlpsamini kanda sarvkesta epiteeliaalsele pinnale. Pärast uuritava aine pealekandmist pannakse eespoolse kambri klaasaken tagasi, et taas tekiks suletud süsteem.

### Kokkupuutejärgne inkubeerimine

30. Pärast kokkupuuteaja lõppu eemaldatakse uuritav aine, negatiivse kontrolli või positiivse kontrolli aine eespoolsest kambrist ja epiteeli pestakse vähemalt kolm korda (või nii kaua, kuni aine jääke ei ole enam võimalik näha) EMEM-lahusega (millesse on lisatud fenoolpunast). Loputamiseks kasutatakse fenoolpunast sisaldavat lahust, kuna fenoolpunase värvusemuutust võib kasutada happeliste või aluseliste materjalide väljapesemise täielikkuse hindamiseks. Sarvesti pestakse rohkem kui kolm korda, kui fenoolpunane muudab veel oma värvi (kollane või punakaslilla) või kuni uuritavat ainet on veel näha. Kui keskkond on uuritavast ainest puhas, loputatakse sarvesti viimast korda (fenoolpunast mittesisaldava) EMEM-lahusega. Fenoolpunast mittesisaldavat EMEM-lahust kasutatakse viimaseks loputuseks, et kindlustada fenoolpunase eemaldamine eespoolsest kambrist enne hädususe mõõtmist. Seejärel täidetakse eespoolne kamber värske (fenoolpunast mittesisaldava) EMEM-lahusega.
31. Vedelike ja pindaktiivsete ainete puhul inkubeeritakse sarvesti pärast loputamist veel kaks tundi temperatuuril  $32 \pm 1$  °C. Mõnes olukorras on pikem ajavahemik pärast kokkupuudet kasulik ja seda tuleks iga kord kaaluda. Tahke ainega töödeldud sarvesti loputatakse põhjalikult pärast neljatunnist kokkupuuteaega, kuid täiendavat inkubeerimist ei ole nende puhul vaja.
32. Vedeliku ja pindaktiivse aine puhul kokkupuutejärgse inkubatsiooni lõpus ning tahke, pindaktiivsete omadusteta aine puhul neljatunnise kokkupuuteaja lõpus registreeritakse iga sarvkesta hägusus ja läbilaskvus. Samuti vaadeldakse iga sarvkesta visuaalselt ja märgitakse üles kõik asjakohased tähelepanekud (näiteks koe lahtikoordumine, uuritava aine jäägid, ebaühtlaselt jaotunud hägusus). Sellised tähelepanekud võivad olla olulised, kuna osutatud muutused võivad mõjutada hägususe mõõtmise näitu.

### Kontrollained

33. Igas katses tehakse paralleelseid mõõtmisi ka negatiivse või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ja positiivse kontrolli ainetega.
34. BCOP-katse läbiviimisel 100-protsendilise vedela ainega tehakse paralleelselt negatiivse kontrolli katse (näiteks 0,9 % naatriumkloriidi lahuse või destilleeritud veega), et kindlaks teha mittespetsiifiliste muutuste esinemine testsüsteemis ja saada võrdlusväärtused katse tulemusnäitajate jaoks. Sellega tõendatakse ka, et katsetingimused ise ei põhjusta muutusi, mida ekslikult võiks ärrituseks pidada.
35. BCOP-katse läbiviimisel lahjendatud vedeliku, pindaktiivse aine või tahke ainega tehakse paralleelselt lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli katse, et kindlaks teha mittespetsiifiliste muutuste esinemine testsüsteemis ja saada võrdlusväärtus katse tulemusnäitaja jaoks. Katses võib kasutada ainult sellist lahustit/pealekandmisvahendit, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda negatiivset mõju katsesüsteemile.
36. Igas eksperimendis tehakse paralleelselt ka positiivse kontrolli katse silmi teadaolevalt ärritava ainega, et tõendada positiivse tulemuse saamist. Kuna käesolevas katsemeetodis kasutatakse BCOP-katset söövitavate või tugevasti ärritavate ainete kindlakstegemiseks, peaks positiivse kontrolli aine soovitatavalt olema kontrollaine, mis selle katsemeetodi puhul põhjustab tugeva mõju. Kuid selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks ärritav mõju olla ülemäära suur.
37. Vedela uuritava aine korral on positiivse kontrolli aineks näiteks dimetüülformamiid või 1 % naatriumhüdroksiid. Tahke uuritava aine korral on positiivse kontrolli aineks näiteks 20 % (mass/ruumala) imidasool 0,9 % naatriumkloriidi lahuses.

38. Võrdlusained võimaldavad hinnata teatava kemikaali- või tooteklassi uurimata kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava aine mõju tugevust teatavas ärritava toime vahemikus.

#### Mõõdetavad tulemusnäitajad

39. Hägusus määratakse sarvkesta läbinud valgushulga mõõtmisega. Sarvkesta hägusust mõõdetakse hägusumõõtja abil, millega saadakse hägususe väärtused pidevas skaalas.
40. Läbilaskvust määratakse värvaine naatriumfluorestseiini hulga järgi, mis tungib läbi kõigi sarvkesta kihtide (st sarvkesta välispinnal asuvast epiteelist kuni sisepinnal asuva endoteelini). Sarvkestahoidja eespoolsesse kambris, mille poole on sarvkesta epiteliaalne kül, lisatakse 1 ml naatriumfluorestseiini lahust (4 mg/ml, kui uuritav aine on vedelik või pindaktiivne aine, ja 5 mg/ml, kui see on pindaktiivsete omadusteta tahke aine), samas kui tagapoolne kamber, mille poole on endotelialne kül, täidetakse värske EMEM-lahusega. Seejärel inkubeeritakse sarvkestahoidjat horisontaalasendis  $90 \pm 5$  minutit  $32 \pm 1$  °C juures. UV/VIS-spektrofotomeetriliselt mõõdetakse tagapoolsesse kambris tunginud naatriumfluorestseiini kogus. 490 nm juures läbiviidavate spektrofotomeetriliste mõõtmiste tulemused registreeritakse optilise tiheduse ( $OD_{490}$ ) või valguse neeldumise ühikutes pidevas skaalas. Fluorestseiini läbilaskvuse väärtused määratakse  $OD_{490}$  väärtustest, mis määratakse nähtava valguse spektrofotomeetriga, kasutades standardseid küvette optilise tee pikkusega 1 cm.
41. Selle asemel võib kasutada 96-augulise mikrotiiterplaadi lugejat, kui: i) on võimalik näidata, et fluorestseiini määramisel on  $OD_{490}$  väärtused plaadilugeja lineaarses piirkonnas, ja ii) 96-augulisel mikrotiiterplaadil kasutatakse õiget fluorestseiiniproovi ruumala, nii et saadakse samad  $OD_{490}$  väärtused kui tavalise 1 cm küvetiga mõõtmisel (selleks tuleb auk (tavaliselt 360 ml) täita võib-olla ääreni).

#### ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

##### Andmete hindamine

42. Kui hägususe ja keskmise läbilaskvuse ( $OD_{490}$ ) väärtused on parandatud tausthägususe ja negatiivse kontrolli läbilaskvuse  $OD_{490}$  väärtustega, tuleks iga katserühma keskmised hägususe ja läbilaskvuse  $OD_{490}$  väärtused asendada empiiriliselt tuletatud võrrandisse, et arvutada *in vitro*-ärritavuse hinne (IVIS) iga katserühma jaoks:

$$IVIS = \text{keskmine hägususe väärtus} + (15 \times \text{keskmine läbilaskvuse } OD_{490} \text{ väärtus})$$

Sina jt (16) teatavad, et selline võrrand tuletati laborisisesest ja laboritevaheliste uuringutega. 36 ainega läbiviidud laboritevahelise uuringu andmeid töödeldi mitmese korrelatsioonanalüüsi meetodiga, et leida *in vivo* ja *in vitro* saadud tulemuste seost kõige paremini kirjeldav võrrand. Kõnealuse analüüsi viisid läbi kahe ettevõtte teadlased, kes said peaaegu identsed võrrandid.

43. Hägususe ja läbilaskvuse väärtusi tuleks ka sõltumatult hinnata, et määrata kindlaks, kas uuritav aine põhjustas söövitust või tugevat ärritust ainult ühe kaudu kahest tulemusnäitajast (vt otsustamise kriteeriumid).

##### Otsustuskriteeriumid

44. Aine, mille IVIS  $\geq 55,1$ , tunnistatakse söövitavaks või tugevat ärritust põhjustavaks aineks. Nagu öeldud punktis 1, kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, tuleks aine klassifitseerimiseks ja etiketile kantava teabe saamiseks teha täiendavaid katseid. BCOP-katse üldine täpsus on 79 % (113/143) kuni 81 % (119/147), valepositiivsete tulemuste määr on 19 % (20/103) kuni 21 % (22/103) ja valenegatiivsete tulemuste määr 16 % (7/43) kuni 25 % (10/40), kui tulemusi võrrelda küüliku silma *in vivo*-katse tulemustega, mis on klassifitseeritud vastavalt EPA (1), ELi (2) või GHSi (3) klassifitseerimissüsteemidele. Kui teatavatesse kemikaaliklassidesse (alkoholid, ketoonid) või füüsikalisse klassi (tahked ained) kuuluvad ained andmebaasist kõrvale jätta, on ELi, EPA ja GHSi klassifitseerimissüsteemide kohaselt BCOP-katse täpsus 87 % (72/83) kuni 92 % (78/85), valepositiivsete tulemuste määr on 12 % (7/58) kuni 16 % (9/56) ja valenegatiivsete tulemuste määr on 0 % (0/27) kuni 12 % (3/26).
45. Isegi kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, võib BCOP-katse siiski olla kasulik koos andmetega, mis saadakse küüliku silma *in vivo*-katsega või muu korralikult valideeritud *in vitro*-katsega, kuna see aitab paremini hinnata BCOP-katse meetodi kasulikkust ja puudusi selliste ainete kindlakstegemisel, millel ei ole tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (töötatakse välja suunisdokumenti silma suhtes toksilisuse määramise *in vitro*-katsemeetodite kohta).



**Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid**

46. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui positiivne kontroll annab IVIS-väärtuse, mis asub kuni kahe standardhälbe kaugusel varasemate uuringute jooksvast keskmisest, mida ajakohastatakse vähemalt iga kolme kuu järel või iga nõuetekohase katse läbiviimise järel laboris, kus katseid tehakse harva (harvem kui kord kuus). Negatiivse kontrolli või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli katses saadud hägususe ja läbilaskvuse väärtused peavad olema madalamad kui tausthägususe ja läbilaskvuse väärtuse ülempiirid, mis on varem kindlaks tehtud veise sarvkestade puhul, mida on töödeldud negatiivse kontrolli või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ainetega.

**Katseprotokoll**

47. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

*Uuritavad ained ja kontrollained:*

keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuurikohane nimetus, mida kasutab *Chemical Abstracts Service* (CAS), seejärel muud nimetused, kui need on teada;

CASi registreerimisnumber (RN), kui on teada;

aine puhtus või segu koostis (massiprotsendina), kui võrd see on teada;

füüsikalised-keemilised omadused nagu füüsikaline olek, lenduvus, pH, püsivus, kemikaaliklass, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimise seisukohast;

uuritava aine/kontrollaine töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (näiteks soojendamine, peenestamine);

püsivus, kui on teada.

*Teave sponsori ja uurimisasutuse kohta:*

sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

silmade päritolu kirjeldus (asutus, milles need koguti);

silmade säilitamis- ja transporditingimused (näiteks silmade kogumise aeg, ajavahemik kogumisest katse alguseni, transpordivahend ja temperatuur transpordi ajal, kasutatud antibiootikumid);

silmade kogumiseks kasutatud loomade eritunnused, kui on teada (näiteks vanus, sugu, looma mass).

*Kasutatud meetodi ja katse-eeskirja põhjendus*

*Katsemeetodi õigsus:*

kasutatud katsemeetodi ajast sõltumatu õigsuse (st täpsuse ja usaldusväärsuse) tagamise meetod (s.o ained, millega katse läbiviimise oskust teatava ajavahemiku järel kontrollitakse, varasemate negatiivse ja positiivse kontrolli andmete kasutamine).

*Katse kõlblikkuse kriteeriumid:*

varasematel andmetel põhinevad paralleelse positiivse ja negatiivse kontrolli kõlblike tulemuste vahemikud;

võimaluse korral varasematel andmetel põhinevad kõlblike paralleelsete võrdlustulemuste vahemikud.

*Katse tingimused:*

kasutatud katsesüsteemi kirjeldus;

kasutatud sarvkestahoidja tüüp;

hägususe ja läbilaskvuse mõõtmiseks kasutatud mõõteriista (näiteks hägususemõõtja ja spektrofotomeetri) kalibreerimist käsitlev teave;

kasutatud veisesarvesti käsitlev teave, seejuures nende kvaliteetsuse kinnitused;

kasutatud katsemeetodi üksikasjad,

uuritavate ainete kasutatud kontsentratsioonid;

kõikide katsemetoodikas tehtud muudatuste kirjeldus;

viide varasematele mudeli andmetele (näiteks negatiivse ja positiivse kontrolli ained, katse läbiviimise oskuse kontrollimiseks kasutatud ained, võrdlusained);

kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus.

#### Tulemused:

üksikutes katsetes saadud andmete tabel (näiteks hägususe ja OD<sub>490</sub> väärtused ning uuritava aine ja positiivse kontrolli, negatiivse kontrolli ning [võimaluse korral] võrdlusaine kontrolli jaoks arvutatud IVIS-väärtused tabelina, sealhulgas vajaduse korral paralleelsete üksikute määramiste tulemused, iga katse keskväärtused ja standardhälve);

muude täheldatud toimete kirjeldus.

#### Tulemuste arutelu

#### Kokkuvõte

#### KIRJANDUS

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006. ELT L 353, 31.12.2008, lk 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Vt

[[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. Vt

[<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. Vt

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

- (6) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 396, 30.12.2006, lk 1.

- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Vt

[[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. In: 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. Vt
- [[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. Vt
- [[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, Italy: 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. Vt
- [<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. Vt
- [[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. Vt
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

---

#### 1. liide

#### MÕISTED

**Täpsus:** katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. See on katsemeetodi kasutuskõlblikkuse üks näitajaid ja üks nn asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse sageli vaheldumisi sõnaga „kooskõla”, mis tähendab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu.

**Võrdlusaine:** aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitas mõju tugevuse vahemikus.

**Sarvkest:** silmamuna eespoolses osas asuv läbipaistev kest, mis katab vikerkesta ja silmaava ning laseb valgusel tungida silma sisse.

**Sarvkesta hägusus:** suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva hägustumise määra. Sarvkesta hägususe suurenemine näitab sarvkesta kahjustuse suurust. Hägusust võib hinnata subjektiivselt, nagu tehakse Draize küülikusilma katses, või objektiivselt aparaadiga, näiteks hägususe mõõtmisega.

**Sarvkesta läbilaskvus:** sarvkesta epiteeli kahjustuse mõõtmine värvaine naatriumfluorestseini koguse järgi, mis tungib läbi kõigi sarvkesta kihtide.

**USA keskkonnaameti (EPA) I kategooria:** söövitav (silmae põõrdumatu kahjustus) või sarvkesta mõjutav või ärritav, mis püsib rohkem kui 21 päeva (1).

**ELi kategooria R41:** koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöördunud 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (2).

**Valenegatiivsete vastuste määr:** kõikide selliste positiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud negatiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

**Valepositiivsete vastuste määr:** kõikide selliste negatiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud positiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – kemikaalide ühtne ülemaailmne klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem):** süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditule tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähte, nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (3).

**GHSi 1. kategooria:** koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolele pinnale ja osutatud mõju ei ole täielikult pöördunud 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (3).

**Oht:** mõjuri või olukorra loomupärane omadus tekitab kahjustust, kui organism, süsteem või (ala-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

**In vitro-ärritavuse hinne (In Vitro Irritancy Score, IVIS):** BCOP-katses kasutatav katseliselt tuletatud valem, millega iga katserühma keskmise hägususe ja keskmise läbilaskvuse väärtused ühendatakse üheks kõnealusele katserühmale avaldatud mõju iseloomustavaks *in vitro*-hinneks (punktisummaks). IVIS = keskmine hägususe väärtus + (15 × keskmine läbilaskvuse väärtus)

**Negatiivne kontroll:** uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katseüsteemi komponente. Sellist proovi töödeldakse koos proovidega, mida mõjutatakse uuritava ainega, ja koos muude kontrollproovidega, et kontrollida, ega lahusti ei mõjuta katseüsteemi.

**Ärritust mitte põhjustav aine:** aine, mida ei ole klassifitseeritud EPA I, II ega III kategooriasse, ELi kategooriatesse R41 või R36 ega GHSi 1., 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silmaärritajaks.

**Silma söövitav aine:** a) aine, mis põhjustab silma kudede pöördumatut kahjustust; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

**Silma ärritav aine:** a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolele pinnale kandmist silmas pöörduva muutuse; b) aine, mis on klassifitseeritud EPA II või III kategooriasse, ELi kategooriasse R36 või GHSi 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

**Silma tugevasti ärritav aine:** a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silmas koekahjustuse, mis ei parane 21 päeva jooksul, või põhjustab tugeva füüsilise nägemislanguse; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

**Hägusumõõtja:** aparaat sarvkesta hägususe mõõtmiseks sarvkesta läbinud valguse hulga kvantitatiivse hindamise alusel. Tüüpilisel seadmel on kaks mõõtmisruumi, millest kummalgi on oma valgusallikas ja fotoelement. Üht ruumi kasutatakse töödeldud sarvkesta mõõtmiseks; teine on aparaadi kalibreerimiseks ja nulliviimiseks. Halogeenlambi valgus suunatakse läbi võrdlusruumi (tühi kamber, millel ei ole aknaid ja milles ei ole vedelikku) fotoelemendile ja võrreldakse valgusega, mis on fotoelemendile suunatud läbi uuritava sarvkestaga ruumi. Fotoelementide andmete võrdlemisest saadakse valguse läbilaskvuse erinevus ja hägususe numbriline väärtus esitatakse digitaalsel näidikul.

**Positiivne kontroll:** paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse ainega, mis teadaolevalt põhjustab positiivse tulemuse. Selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur.

**Usaldusväärsus:** sellega mõõdetakse katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse ja laborisisese korratavuse arvutamiseks.

**Lahusti/pealekandmisvahendi kontroll:** uuritava ainega töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või pealekandmisvahendit; sellist proovi töödeldakse sarnaselt uuritava ainega töödeldud proovile ja muudele kontrollproovidele, et määrata kindlaks samas lahustis või pealekandmisvahendis lahustatud uuritava ainega töödeldud proovide nulljoone tase. Kui paralleelselt katsetatakse negatiivse kontrolli proovi, siis näitab lahusti/pealekandmisvahendi proov ka seda, kas lahusti või pealekandmisvahend mõjutab katsesüsteemi.

**Astmeline katsetamine:** samm-sammulise katsetamise strateegia, milles enne järgmise etappi minekut vaadatakse kindlaksmääratud korras läbi kogu uuritava aine kohta olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et määrata kindlaks, kas on piisavalt teavet riskirühma klassifitseerimise otsuse tegemiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab uuritava aine ärritavate omaduste kohta otsuse teha, ei ole edasisi katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa teha otsust uuritava aine ärritavate omaduste kohta, jätkatakse samm-sammult järjestikuste loomkatsete tegemist, kuni aine saab üheselt klassifitseerida.

**Valideeritud katsemeetod:** katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul.

**Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine:** protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni aine võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

---

## 2. liide

### Ained, millega kontrollitakse BCOP-meetodi valdamist

Enne kõnealuse meetodiga seotud katsemeetodi tavakasutusse võtmist võivad laborid soovida tõendada meetodi tehnilist valdamist ja määrata selleks õigesti tabelis 1 soovitatud 10 aine klassifikatsioon söövitava toime järgi. Kõnealused ained on valitud nii, et oleks esindatud silma paikse ärrituse/söövituse põhjustamise kogu skaala, mis põhineb küüliku silmaga *in vivo*-katsetes (TG 405) saadud tulemustel (st 1., 2.A ja 2.B kategooria või ÜRO GHSi kohaselt „klassifitseerimata ja märgiseta”) (3), (7). Pidades aga silmas kõnealuste katsete valideeritud kasulikkust (tehakse kindlaks vaid silma söövitavad või tugevasti ärritavad ained), on meetodi valdamise tõendamisel tegemist vaid kahesuguste tulemustega klassifitseerimise seisukohast (söövitav / tugevasti ärritav või mittesöövitav / silma mitte tugevasti ärritav). Muud valikukriteeriumid olid järgmised: ained peaksid olema kaubanduses saadaval, nende kohta peaksid olema kvaliteetsed *in vivo*-võrdlusandmed ning on kvaliteetsed andmed, mis on määratud kahe *in vitro*-meetodiga, mille jaoks on välja töötatud katse läbiviimise suunised. Seepärast valiti ärritavad ained 122 võrdlusaine nimestikust, mida ICCVAM soovib kasutada silma suhtes toksilisuse *in vitro*-katsete valideerimiseks (vt H liide: ICCVAMi soovitatud võrdlusained) (5). Võrdlusandmeid on esitatud ka ICCVAMi taustülevaatedokumentides BCOP-katse ja isoleeritud kanasilma katse (*Isolated Chicken Eye test method*, ICE-katse) jaoks (17), (18).

Tabel 1

Soovitavad ained BCOP-meetodi tehnilise valdamise tõendamiseks

Aine	CASi nr	Ühendiklass ( <sup>1</sup> )	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> -klassifikatsioon ( <sup>2</sup> )	<i>In vitro</i> -klassifikatsioon ( <sup>3</sup> )
Bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Kloorheksidiin	55-56-1	Amiin, amidiin	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Dibensoüül-L-viinhape	2743-38-6	Karboksüülhappe ester	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Imidasool	288-32-4	Heterotsükkel	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Trikloroäädikhape (30 %)	76-03-9	Karboksüülhape	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
2,6-Diklorobensoüülkloriid	4659-45-4	Atsüülhaliid	Vedel	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Etüül-2-metüülatsetaat	609-14-3	Ketoon, ester	Vedel	2.B kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Ammooniumnitraat	6484-52-2	Anorgaaniline sool	Tahke	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Glütserool	56-81-5	Alkohol	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
<i>n</i> -heksaan	110-54-3	Atsükliline süsivesinik	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav

Lühend: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number.

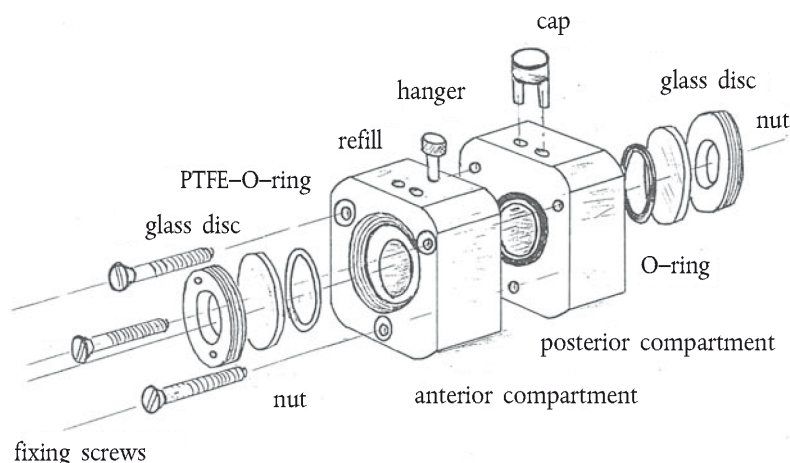
<sup>(1)</sup> Kemikaaliklass on igale uuritavale ainele omistatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniiraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (vt <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).<sup>(2)</sup> Vastavalt küüliku silma *in vivo*-katse (OECD TG 405) tulemustele ja kasutades ÜRO GHSi süsteemi (3), (7).<sup>(3)</sup> Vastavalt BCOP-katse ja ICE-katse tulemustele.

## 3. liide

## BCOP-KATSES KASUTATAV SARVKESTAHOIDJA

1. BCOP-katses kasutatav sarvkestahoidja valmistatakse inertsest materjalist (näiteks polüpropüleenist). Sarvkestahoidjal on kaks poolt (eespoolne ja tagapoolne kamber) ja nendes on sarnased silindrilised sisekambrid. Kummagi kambri ruumala on 5 ml ja kumbki kamber lõpeb klaasaknaga, läbi mille tehakse hõigususe mõõtmisi. Kummagi sisekambrid diameeter on 1,7 cm ja pikkus 2,2 cm (<sup>1</sup>). Tagapoolsele kambrile asetatud rõngastihendit kasutatakse lekete ärahoidmiseks. Sarvkest paigutatakse endotelialse küljega tagapoolse kambri rõngastihendile ja eespoolne kamber paigutatakse sarvkesta epitelialsele küljele. Kambreid hoiavad koos kolm roostevabast terasest kruvi, mis asuvad kambri väliservadel. Kummagi kambri otsas on klaasaken, mida on võimalik eemaldada, et võimaldada hõlpsat juurdepääsu sarvkestale. Üks rõngastihend on ka klaasakna ja kambri vahel, et vältida lekkimist. Kaks ava kummagi kambri ülemisel küljel võimaldavad lisada ja eemaldada lahustit ja uuritavat ainet. Töötlemise ja inkubeerimise ajal on avad suletud kummikorkidega.

(<sup>1</sup>) Esitatud mõõtmega sarvkestahoidjat kasutatakse 12–60 kuu vanuse lehma sarvkesta puhul. Kui kasutatakse 6–12 kuu vanuse looma sarvkesta, peaks sarvkestahoidja olema projekteeritud nii, et kummagi kambri ruumala on 4 ml ning kummagi sisekambrid diameeter on 1,5 cm ja pikkus on 2,2 cm. Uue kujundusega sarvkestahoidja puhul on väga oluline, et ainega kokkupuutuva sarvkestaosa pindala ja tagapoolse kambri ruumala suhe oleks samasugune kui traditsioonilise sarvkestahoidja puhul. Selle tagamine on oluline selleks, et määrata õigesti läbilaskvuse väärtused, mida kasutatakse IVIS-väärtuse arvutamiseks esitatud valemi järgi.



Sõnastik

Glass disc: klaasketas

PTFE-O-ring: polütetrafluoroetüleenist rõngastihend

Refill: täitmisava

Hanger: hoidja

Cap: kork

Nut: kinnitusrõngas

O-ring: rõngastihend

Posterior compartment: tagapoolne kamber

Anterior compartment: eespoolne kamber

Fixing screws: kinnituskruvid

## HÄGUSUSMÕÕTJA

2. Hägusumõõtja on seade valguse läbilaskvuse mõõtmiseks. Halogeenlambi valgus suunatakse läbi võrdlusruumi (tühi kamber, millel ei ole aknaid ja milles ei ole vedelikku) fotoelemendile ja võrreldakse valgusega, mis on fotoelemendile suunatud läbi uuritava sarvestaga ruumi. Fotoelementide andmete võrdlemisest saadakse valguse läbilaskvuse erinevus ja hägususe numbriline väärtus esitatakse digitaalsel näidikul. Tehakse kindlaks hägususihi-  
kud.
3. Hägusumõõtja peaks tagama lineaarse sõltuvuse kogu hägususe lugemite vahemikus, mis ulatub ennustusmudelil kirjeldatud eri klassifikatsioonides kasutatavate kriitiliste väärtusteni (st kuni kriitiliste väärtusteni, mille alusel aine tunnistatakse söövitavaks või tugevasti ärritavaks). Lineaarsete ja täpsete lugemite saamiseks kuni 78-80 hägususihi-  
kuni on hägusumõõtja vaja kaliibrida, kasutades rida kaliibrimisfiltreid. Kaliibrimisfiltrid (hägusad polüesterlehed) pannakse kaliibrimiskambrisse (sarvestahoidja, mis on projekteeritud kaliibrimisfiltri hoidmiseks) ja võetakse hägu-  
sumõõtja lugem. Kaliibrimiskamber on projekteeritud nii, et see hoiaks kaliibrimisfiltreid ligikaudu samas kohas valgusallika ja fotoelemendi vahel, milles asub sarvest hägususe mõõtmise ajal. Hägusumõõtja kaliibritakse esmalt hägususe lugemile 0, kasutades kaliibrimiskambrist ilma kaliibrimisfiltrita. Seejärel paigutatakse kaliibrimiskambrisse üksikhaaval kolm eri kaliibrimisfiltrit ja mõõdetakse hägususe. Kaliibrimisfiltritega 1, 2 ja 3 tuleks saada nende ettenähtud hägusuväärtuste lugemid, vastavalt 75, 150 ja 225 hägususe ühikut  $\pm 5\%$ .

**B.48. ISOLEERITUD KANASILMA MEETOD SILMA SÖÖVITAVATE JA TUGEVALT ÄRRITAVATE AINETE KINDLAKSTEGEMISEKS****SISSEJUHATUS**

1. Isoleeritud kanasilma meetod (*Isolated Chicken Eye*, ICE) on *in vitro*-katsemeetod, mida võib teataval asjaoludel ja teatavate piirangutega kasutada, et klassifitseerida aineid ja segusid silma söövitavaks ja tugevasti ärritavaks (1), (2), (3). Käesolevas katse-meetodis on tugevasti ärritava toimega aineks või seguks määratletud sellised, mis tekitavad küülikul pärast pealekandmist vähemalt 21 päeva püsiva silmakahjustuse. Katsemeetodit ei peeta küüliku silma *in vivo*-katse täieliku asendamise jaoks kõlblikuks; ICE-meetodit soovitatakse kasutada korrapärast astmelise katsetamise strateegia osana õigusliku klassifitseerimise ja märgistamise jaoks konkreetses kasutusvaldkonnas (4), (5). Käesoleva katse kohaselt positiivseid uuritavaid aineid ja segusid (6) võib klassifitseerida silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks ilma edasise katsetamiseta küülikutel. Negatiivse tulemuse andnud ainet on vaja katsetada küülikul, kasutades järjestikuste katsete strateegiat, mis on esitatud OECD katse-suunistes 405 (7) (käesoleva lisa B.5 peatükk).
2. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada menetlusi, mida kasutatakse uuritava aine võimaliku silma söövitava või tugevasti ärritava toime hindamiseks, tuginedes aine omadusele mõjuda toksiliselt värskest eraldatud kanasilmale. Toksilist mõju sarvkestale mõõdetakse: i) hägususe kvalitatiivse hindamisega, ii) epiteelkahjustuse kvalitatiivse hindamisega, kasutades fluorestsensiinid silma (fluorestsensiini peetumine silmas), iii) sarvkesta paksuse suurenemise (turse) mõõtmisega ja iv) makroskoopilise morfoloogilise pinnakahjustuse kvalitatiivse hindamisega. Sarvkesta hägusust, turset ja kahjustust hinnatakse pärast uuritava ainega kokkupuutumist individuaalselt ja seejärel andmed koondatakse silma ärritava toime klassifitseerimiseks.
3. ICE-meetodiga on uuritud ka silmaärritajaid, mille tekitatud kahjustused paranevad vähem kui 21 päevaga, samuti aineid, mis silmi ei ärrita. Kuid sellistesse kategooriatesse kuuluvate ainete puhul ei ole ICE-meetodi täpsust ja usaldusväärsust ametlikult hinnatud.
4. Mõisted on esitatud 1. liites.

**ALGSED KAALUTLUSED JA PIIRANGUD**

5. Käesolev katsemeetod põhineb alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) ICE-meetodi eeskirjal (8), mis töötati välja rahvusvahelise valideerimisuringu alusel (4), (5), (9), millesse andsid oma panuse alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JCVAM) ja Madalmaade uurimisinstituudi TNO toksikoloogia ja rakendusfarmakoloogia elukvaliteedi osakond. Eeskirja aluseks on avaldatud andmetest saadud teave, samuti TNOs praegu kasutatav eeskiri (10), (11), (12), (13), (14).
6. Käesoleva meetodi kindlakstehtud piirangud on seotud alkoholide valepositiivsete tulemuste ning tahkete ainete ja pindaktiivsete ainete valenegatiivsete tulemuste määraga (vt punkt 47) (4). Kui osutatud kemikaalklassidesse ja füüsikalistesse aineklassidesse kuuluvad ained andmebaasist välja jätta, suureneb ICE-meetodi täpsus ELi ja USA keskkonnaameti (EPA) klassifitseerimissüsteemi ning ka ülemaailmselt ühtlustatud klassifitseerimissüsteemi (GHS) järgi oluliselt (4). Pidades silmas kõnealuse katse eesmärki (teha üksnes kindlaks silmi söövitavad või tugevasti ärritavad ained), ei ole valenegatiivsed tulemused väga olulised, kuna selliseid aineid uuritakse reguleerivate asutuste nõuetest olenevalt edasi küülikutel või muudes korralikult valideeritud *in vitro*-katsetes, kasutades järjestikuste katsete strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi. Lisaks ei võimaldanud senine valideerimisandmebaas õigesti hinnata mõnesid kemikaali- või tooteklasse (näiteks segusid). Kuid teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist kõigi uuritava materjali tüüpide, kaasa arvatud segude puhul, kusjuures positiivse tulemuse võiks lugeda tõendiks, et tegemist on silma söövitava või tugevasti ärritava toimega. Alkoholidena saadud positiivseid tulemusi tuleks võtta ettevaatusega, kuna nende puhul on oht mõju üle hinnata.
7. Kanasilmadega tehtavate toimingute puhul tuleks alati järgida katselaboris kohaldatavaid inimestelt ja loomadelt saadud materjalide, kaasa arvatud kudede ja koevedelike jne käsitlemise eeskirju ja korda. Soovitatakse kasutada üldisi laborite ettevaatusmeetmeid (15).
8. Katsemeetodi kasutatavust piirab asjaolu, et kuigi selle puhul võetakse arvesse mõnesid silmaga seotud mõjusid, mida on hinnatud küüliku silma ärritavuse katses, ja mingil määral ka mõjude tugevust, ei peegelda katse silma sidekesta ja vikerkesta kahjustusi. Kuigi ICE-katsega ei saa põhimõtteliselt hinnata sarvkestakahjustuste pöördumust, on küüliku silma uuringute alusel soovitatud kasutada sarvkestakahjustuse esialgset sügavust pöördumatu ja pöörduva mõju eristamiseks (16). Lõpuks ei võimalda ICE-katse hinnata ainete silmasattumisega kaasneva süsteemse toksilisuse võimalust.
9. Jätkatakse uuringuid ICE-katse kasulikkuse ja piirangute edasiseks iseloomustamiseks ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (vt ka punkt 48). Meetodi kasutajatel palutakse valideerimisorganisatsioonidele saata näidiseid ja/või andmeid, et ametlikult hinnata ICE-katse võimalikku muud tulevast kasutust, sealhulgas ka ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet.

10. Iga labor, kes alustab katsemeetodi kasutamist, peaks oma taseme kontrollimiseks kasutama 2. liites esitatud kemikaale. Labor võib osutatud kemikaale kasutada selleks, et tõendada oma tehnilist pädevust ICE-katse läbiviimisel, enne kui ta esitab ICE-katsega saadud andmed regulatiivseks ohu klassifitseerimiseks.

#### KATSE PÕHIMÕTE

11. ICE-meetod on organotüüpne mudel, mille abil on lühiajaliselt võimalik säilitada kanasilma *in vitro*. Katsemeetodis hinnatakse uuritava aine põhjustatud kahjustust sarvkesta turse, hägususe tekkimise ja fluorestseini peetumise mõõtmisega. Viimase kahe näitaja puhul on tegemist kvalitatiivse hindamisega, sarvkesta turse analüüsi puhul on ette nähtud kvantitatiivne hindamine. Iga mõõtmise tulemus teisendatakse kas kvantitatiivseks punktisummaks (hindeks), mida kasutatakse üldise ärritavusnäitaja arvutamiseks, või omistatakse sellele kvalitatiivne kategooria, mida kasutatakse silma söövitava ja tugevasti ärritava toime *in vitro*-klassifikatsiooni omistamiseks. Kumbagi neist tulemustest võib kasutada selleks, et ennustada aine võimet söövitada või tugevasti ärritada silma *in vivo* (vt otsustamise kriteeriumid).

#### Kanasilmade hankimise allikad, kasutatavate kanade vanus

12. Kõnealuseks katseks on kasutatud silmi, mis on kogutud kanadelt tapamajas, kus need tapetakse inimtoiduks; see kõrvaldab katseloomade kasutamise vajaduse. Kasutatakse üksnes silmi, mis on võetud tervetelt lindudelt, keda peetakse sobivaks inimtoidus kasutamiseks.
13. Kuigi kanade sobivaima vanuse hindamiseks ei ole läbi viidud kontrollitud uuringut, on tavaliselt kasutatud kõnealuseks katseks tapamajas tapetud kevadisi kanu (st vanus umbes 7 nädalat, kaal 1,5–2,5 kg).

#### Silmade kogumine ja toimetamine laborisse

14. Pead tuleks kõrvaldada kohe pärast kanade uimastamist, tavaliselt elektrilöögiga, ja kõri läbilõikamist, et veri välja lasta. Labor peaks olema kohaliku tapamaja lähedal, nii et kanade pead saaks kiiresti toimetada tapamajast laborisse, et viia miinimumini lagunemisest ja/või bakteritega saastumisest tingitud kahjustused. Ajavahemik kanapeade kogumise ja silmade ICE-katse kasutamise vahel peaks olema võimalikult lühike (tavaliselt kuni kaks tundi), kusjuures tuleks tõendada, et katsetulemused ei sõltu konkreetsest ajavahemikust. Tulemuste aluseks on silmade valimise kriteeriumid ning positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes saadud tulemused. Kõik katses kasutatud silmad peavad pärinema ühest ja samast silmade rühmast, mis on kogutud ühel konkreetsel päeval.
15. Kuna silmad eraldatakse laboris, veetakse kanade pead tervelt tapamajast laborisse toatemperatuuril plastkastides, milles niiskuse suurendamiseks on isotoonilise keedusoolalahusega niisutatud käterätid.

#### ICE-katses kasutatavate silmade valimise kriteeriumid

16. Silmad, millel kohe peale silmakoopast väljavõtmist on kõrge fluorestseiniga värvumise näitaja (üle 0,5) või sarvkesta hägususe hinne (üle 0,5), jäetakse kõrvale.
17. Igas katserühmas ja paralleelselt läbiviidavas positiivse kontrolli katses kasutatakse vähemalt kolme silma. Negatiivse kontrolli rühmas või lahusti kontrollis (kui kasutatakse muud lahustit kui keedusoolalahust) kasutatakse vähemalt ühte silma.

#### KATSE KÄIK

##### Silmade ettevalmistamine

18. Silmalaud lõigatakse hoolikalt ära, vältides sarvkesta vigastamist. Sarvkesta kvaliteeti kontrollitakse kiiresti ühe tilga 2 % (mass/ruumala) naatriumfluorestseini lahusega, mis kantakse sarvkesta pinnale mõneks sekundiks ja loputatakse siis maha isotoonilise keedusoolalahusega. Fluorestseiniga töödeldud silmi vaadeldakse siis pilulamp-mikroskoobiga, et teha kindlaks, et sarvest on vigastamata (st fluorestseini peetumine ja sarvkesta hägususe hinne on  $\leq 0,5$ ).
19. Kui sarvest on vigastamata, jätkatakse silma väljalõikamist silmakoopast, vältides sarvkesta vigastamist. Silmamuna tõmmatakse silmakoopast välja, hoides pilkekilet kindlalt kirurgitangidega, ja silmalihased lõigatakse läbi painutatud nüriotsaliste kääridega. Oluline on vältida sarvkesta vigastust liigse rõhu tõttu (st kokkusurumisest tingitud artefakte).
20. Kui silm on silmakoopast välja tõmmatud, tuleb silmamuna külge jätta nähtav osa silmanärvi. Kui silm on silmakoopast välja võetud, pannakse see filterpaberile ning lõigatakse ära pilkekile ja muud sidekoelised osad.



21. Väljavõetud silm paigutatakse roostevabast terasest silmahoidja klambri vahele, nii et sarvkest on vertikaalasendis. Silmahoidja pannakse seejärel tilgutusaparaadi (superfusiooniaparaadi) kambrisse (16). Silmahoidjad tuleb tilgutusaparaadis paigutada nii, et isotooniline keedusoolalahus niisutaks kogu sarvkesta. Tilgutusaparaadi kambrites tuleks hoida temperatuuri  $32 \pm 1,5$  °C. 3. liites on esitatud tüüpilise tilgutusaparaadi ja silmahoidjate skeem; sellise aparaadi võib osta või valmistada ise. Aparaat võib muuta vastavalt iga labori vajadustele (näiteks vajaliku arvu silmade paigutamiseks aparaati).
22. Pärast tilgutusaparaati paigutamist kontrollitakse silmi uuesti pilulamp-mikroskoobiga, et nende hulgas ei oleks väljavõtmisega vigastatud silmi. Samal ajal mõõdetakse sarvkesta tipus sarvkesta paksus, kasutades pilulamp-mikroskoobi sügavusmõõtmisseadet. Asendatakse kõik järgmiste tunnustega silmad: i) fluoresteini peetumise hinne üle 0,5, ii) sarvkesta hägusus üle 0,5 või iii) omavad muid kahjustuse tunnuseid. Osutatud kriteeriumide põhjal kõrvaldamata jäetud silmade hulgast kõrvaldatakse veel silmad, mille sarvkesta paksus kaldub üle 10 % kõrvale kõikide silmade kohta arvatud keskvaärtusest. Töötajad peaksid arvestama, et pilu erineva laiuse korral võib pilulamp-mikroskoop anda tulemuseks erinevaid sarvkesta paksuse väärtusi. Pilu laiuseks tuleb seada 0,095 mm.
23. Kui kõik silmad on üle vaadatud ja kõlblikuks tunnistatud, inkubeeritakse neid umbes 45–60 minutit, et need saavutaksid katseüsteemiga tasakaalu, enne kui neile uuritav aine peale kantakse. Pärast tasakaalustumist mõõdetakse sarvkesta paksuse ja hägususe võrdlustase (0-tase), mis jääb baasjooneks (väärtused ajahetkel 0). Väljalõikamise ajal määratud fluoresteini peetumise hinnet kasutatakse kõnealuse tulemusnäitaja baasjoonena.

#### Uuritava aine pealekandmine

24. Kohe peale võrdlustaseme (0-taseme) mõõtmist võetakse silm (koos silmahoidjaga) tilgutusaparaadist välja, pannakse horisontaalasendisse ja uuritav aine kantakse sarvkestale.
25. Vedelaid uuritavaid aineid mõõdetakse tavaliselt lahjendamata kujul, kuid neid võib ka lahjendada, kui seda peetakse vajalikuks (näiteks kui see on osa katse korraldusest). Eelistatud lahusti ainete lahjendamiseks on füsioloogiline keedusoolalahus. Kontrollitud tingimustes võib kasutada ka muid lahusteid, kuid muude lahustite kui füsioloogilise keedusoolalahuse sobivust on vaja tõendada.
26. Vedelad uuritavad ained kantakse sarvkestale nii, et kogu sarvkesta pind on uuritava ainega ühtlaselt kaetud; tavaline ruumala on 0,03 ml.
27. Tahked ained tuleks jahvatada võimalikult peeneks uhmris uhmrinuiaga või muu peenestamisvahendiga. Pulber kantakse sarvkestale niimoodi, et pind oleks uuritava ainega ühtlaselt kaetud; tavaline kogus on 0,03 g.
28. Uuritav (vedel või tahke) aine kantakse 10 sekundiks peale ja loputatakse siis silma pealt maha toatemperatuuril oleva isotoonilise keedusoolalahusega (umbes 20 ml). Silm (koos silmahoidjaga) pannakse seejärel tagasi tilgutusaparaadi esialgsesse vertikaalasendisse.

#### Kontrollained

29. Igas katses tuleks teha paralleelseid mõõtmisi ka negatiivse või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ja positiivse kontrolli ainetega.
30. 100-protsendilise vedeliku või tahke aine uurimise korral kasutatakse ICE-katses paralleelse negatiivse kontrollina füsioloogilist keedusoolalahust, et teha kindlaks katseüsteemi mittespetsiifilisi muutusi ning tõendada, et katsetingimused ise ei tekita ekslikult ärritusnähtusid.
31. Lahjendatud vedeliku uurimise korral tehakse ICE-katses paralleelselt lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli katse, et teha kindlaks katseüsteemi mittespetsiifilisi muutusi ning tõendada, et katsetingimused ise ei tekita ekslikult ärritusnähtusid. Nagu öeldud punktis 25, võib katses kasutada ainult sellist lahustit/pealekandmisvahendit, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda negatiivset mõju katseüsteemile.

32. Igas eksperimendis tehakse paralleelselt ka positiivse kontrolli katse silmi teadaolevalt ärritava ainega, et tõendada positiivse tulemuse saamist. Kuna käesolevas katsemeetodis kasutatakse ICE-katset söövitavate või tugevasti ärritavate ainete kindlakstegemiseks, peaks positiivse kontrolli aine olema võrdlusaine, mis selle katsemeetodi puhul põhjustab tugeva mõju. Kuid selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur. Positiivse kontrolli kohta tuleks saada piisaval hulgal *in vitro*-andmeid, nii et saaks arvutada positiivse kontrolli väärtuste statistiliselt määratletud vahemiku. Kui konkreetse positiivse kontrolli jaoks ei ole piisavalt varasemaid täpseid ICE-katse andmeid, võib sellise teabe saamiseks olla vaja korraldada eraldi uuringuid.
33. Vedelate uuritavate ainete positiivse kontrolli näideteks on 10 % äädikhape või 5 % bensalkooniumkloriid; tahkete uuritavate ainete positiivse kontrolli näideteks on naatriumhüdroksiid või imidasool.
34. Võrdlusained võimaldavad hinnata teatavas kemikaali- või tooteklassi kuuluva uurimata kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava aine mõju tugevust teatavas ärritava toime vahemikus.

#### Mõõdetavad tulemusnäitajad

35. Sarvkesti hinnatakse enne uuritava ainega töötlemist ning 30, 75, 120, 180 ja 240 minutit ( $\pm 5$  minutit) pärast töötlemisejärgset loputamist. Sellised mõõtmiste ajad annavad vajaliku hulga mõõtmisi töötlemisele järgneva nelja-tunnilise ajavahemiku jooksul; samas jääb mõõtmiste vahele piisavalt aega, et nõutavad vaatlused saaks teha kõikide silmadega.
36. Mõõdetakse järgmisi tulemusnäitajaid: sarvkesta hägusus, turse, fluorestseiini peetumine ja morfoloogilised muutused (näiteks epiteeli augustumine või lahtikoorumine). Kõiki tulemusnäitajaid peale fluorestseiini peetumise (mida määratakse ainult enne töötlemist ja 30 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega) määratakse igal eespool osutatud ajahetkel.
37. Sarvkesta hägususe, fluorestseiini peetumise, morfoloogiliste muutuste ja histopatoloogia (kui seda uuritakse) muutusi on soovitatav dokumenteerida fotodega.
38. Peale viimast vaatlust nelja tunni pärast on soovitatav silmad konserveerida sobiva fiksaatoriga (näiteks puhverdatud neutraalse formaliniga), et seda oleks võimalik histopatoloogiliselt uurida.
39. Sarvkesta turse määratakse sarvkesta paksuse mõõtmisega, kasutades pilulamp-mikroskoobile lisatud optilist paksusemõõdjat. Sarvkesta turse väljendatakse protsendina ja arvutatakse sarvkesta paksuse mõõtmisandmetest järgmise valemiga:

$$\left( \frac{\text{sarvkesta paksus ajahetkel } t - \text{sarvkesta paksus ajahetkel } = 0}{\text{sarvkesta paksus ajahetkel } = 0} \right) \times 100$$

40. Arvutatakse kõikide katses kasutatud silmade keskmine sarvkesta turse protsent iga uuritud ajahetke jaoks. Igal ajahetkel registreeritud kõige kõrgema keskmise sarvkestaturse hinde põhjal omistatakse igale uuritavale ainele üldine kategooriahinne.
41. Sarvkesta hägusus arvutatakse, kasutades hindamiseks kõige rohkem hägustunud sarvkestaosa pindala. Arvutatakse kõikide katses kasutatud silmade keskmine sarvkesta hägususe väärtus iga uuritud ajahetke jaoks. Igal ajahetkel registreeritud kõige kõrgema keskmise sarvkesta hägususe hinde põhjal omistatakse igale uuritavale ainele üldine kategooriahinne (tabel 1).

Tabel 1.

Sarvkesta hägususe hinne

Hinne	Vaatlusandmed
0	hägusust ei ole
0,5	väga nõrk hägusus

Hinne	Vaatlusandmed
1	hajutatud või ebaselgete piirjoontega alad; vikerkesta detailid on selgelt nähtavad
2	kergesti märgatav poolläbipaistev ala; vikerkesta detailid on veidi ebaselged
3	sarvkest on tugevalt hägune; vikerkesta konkreetsed detailid ei ole nähtavad; pupilli suurus on vaevunähtav
4	sarvkest on täielikult hägune; pupilli ei ole näha

42. Keskmine fluorestseiini peetumise väärtus arvutatakse kõikide katses kasutatavate silmade jaoks ainult ajahetke 30 minutit jaoks; osutatud väärtust kasutatakse igale uuritavale ainele üldise kategooriahinne omistamisel (tabel 2).

Tabel 2.

## Fluorestseiini peetumise hinne

Hinne	Vaatlusandmed
0	fluorestseiini peetumist ei ole
0,5	üksikud rakud on väga nõrgalt värvunud
1	üksikuid värvunud rakke on hajusalt kogu töödeldud sarvkestal
2	värvunud üksikud rakud moodustavad värvumistsentreid või -laike
3	peetunud fluorestseiniga sarvkestaalad moodustavad ulatuslikke laiike

43. Morfoloogiline mõju hõlmab järgmist: „auklikud” sarvkesta epiteelirakud, lahtikoorunud epiteel, sarvkesta pinna karedaks muutumine ning uuritava aine „kleepumine” sarvkestale. Sellised nähtused võivad olla erineva raskusastmega ja esineda samaaegselt. Nende nähtuste klassifitseerimine on subjektiivne ja sõltub uurija tõlgendusest.

## ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

## Andmete hindamine

44. Sarvkesta hägususe ja turse ning fluorestseiini peetumise tulemusi tuleb hinnata eraldi, et leida ICE-klass iga tulemusnäitaja jaoks. Iga tulemusnäitaja ICE-klassid koondatakse seejärel iga uuritava aine ärritavuse klassifikatsiooni saamiseks.

## Otsustamiskriteeriumid

45. Kui iga tulemusnäitaja on hinnatud, saab eelnevalt määratud vahemike alusel omistada ICE-klassid. Sarvkesta paksuse (tabel 3), hägususe (tabel 4) ja fluorestseiini peetumise (tabel 5) tõlgendamine nelja ICE-klassi kasutamisega toimub järgnevate skaalaastmete alusel:

Tabel 3.

## Sarvkesta turse ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine sarvkesta turse (%) (*)	ICE-klass
0 kuni 5	I
> 5 kuni 12	II
> 12 kuni 18 (> 75 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega)	II
> 12 kuni 18 (≤ 75 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega)	III
> 18 kuni 26	III

Keskmine sarvkesta turse (%) (*)	ICE-klass
> 26 kuni 32 (> 75 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega)	III
> 26 kuni 32 ( $\leq$ 75 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega)	IV
> 32	IV

(\*) Sarvkesta turse hindeid saab kasutada ainult siis, kui sarvkesta paksus on mõõdetud pilulamp-mikroskoobiga Haag-Streit BP900, kasutades sügavusmõõtmisseadet nr I ja pilulaiust  $9\frac{1}{2}$ , mis vastab 0,095 millimeetrile. Töötajad peaksid arvestama, et pilu erineva laiuse korral võib pilulamp-mikroskoop anda tulemuseks erinevaid sarvkesta paksuse väärtusi.

Tabel 4.

## Sarvkesta hägususe ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine maksimaalse hägususe hinne (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(\*) Vt tabel 1.

Tabel 5.

## Fluorestseiini peetumise ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine fluorestseiini peetumise hinne 30 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(\*) Vt tabel 2.

46. Uuritava aine üldine *in vitro*-ärritavuse klassifikatsioon hinnatakse ärritavusnäitajate kategooriate kombineerimisega, võttes arvesse sarvkesta turse, sarvkesta hägususe ja fluorestseiini peetumise kategooriaid ning kasutades tabelis 6 esitatud skeemi.

Tabel 6.

Üldise *in vitro*-ärritavuse klassifikatsiooni määramine

Klassifikatsioon	Kolme tulemusnäitaja kombineerimine
Söövitav / tugevasti ärritav	$3 \times IV$ $2 \times IV, 1 \times III$ $2 \times IV, 1 \times II$ (*) $2 \times IV, 1 \times I$ (*) 30 minuti pärast sarvkesta hägususe $\geq 3$ (vähemalt kahes silmas) Mingil ajahetkel sarvkesta hägususe = 4 (vähemalt kahes silmas) Epiteeli tugev lahtikoorumine (vähemalt ühes silmas)

(\*) Ebatõenäolisemad kombinatsioonid

47. Nagu öeldud punktis 1, kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, tuleks aine klassifitseerimiseks ja etiketile kantava teabe saamiseks teha täiendavaid katseid. Silma söövitavate ja tugevasti ärritavate ainete kindlakstegemisel on ICE-katse üldine täpsus 83 % (120/144) kuni 87 % (134/154), valepositiivsete tulemuste määr on 6 % (7/116) kuni 8 % (9/116) ja valenegatiivsete tulemuste määr 41 % (13/32) kuni 50 % (15/30), kui tulemusi võrrelda küüliku silma *in vivo*-katse tulemustega, mis on klassifitseeritud vastavalt EPA (1), ELi (2) või GHSi (3) klassifitseerimissüsteemidele. Kui teatavatesse kemikaaliklassidesse (alkoholid ja pindaktiivsed ained) või füüsikalisse klassi (tahked ained) kuuluvad ained andmebaasist kõrvale jätta, on ELi, EPA ja GHSi klassifitseerimissüsteemide kohaselt ICE-katse täpsus 91 % (75/82) kuni 92 % (69/75), valepositiivsete tulemuste määr on 5 % (4/73) kuni 6 % (4/70) ja valenegatiivsete tulemuste määr on 29 % (2/7) kuni 33 % (3/9) (4).
48. Isegi kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, võib ICE-katse siiski olla kasulik koos andmetega, mis saadakse küüliku silma *in vivo*-katsega või muu korralikult valideeritud *in vitro*-katsega, kuna see aitab paremini hinnata ICE-katse meetodi kasulikkust ja puudusi selliste ainete kindlakstegemiseks, millel ei ole tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (töötatakse välja suunisdokumenti silma toksilisuse *in vitro*-katsemeetodite kasutamise kohta).

#### Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

49. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui paralleelselt läbiviidud negatiivse kontrolli või pealekandmisvahendi / lahusti kontrolli katsed ja positiivse kontrolli katsed annavad ärritavuse klassifikatsiooni tulemused, mille kohaselt esimesel juhul on tegemist silma mitteärritavate ja teisel juhul silma tugevasti ärritavate / söövitavate ainetega.

#### Katseprotokoll

50. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

##### *Uuritavad ained ja kontrollained*

keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuurikohane nimetus, mida kasutab *Chemical Abstracts Service* (CAS), seejärel muud nimetused, kui need on teada;

CASi registreerimisnumber (RN), kui on teada;

aine puhtus või segu koostis (massiprotsendina), kuivõrd see on teada;

füüsikalised-keemilised omadused nagu füüsikaline olek, lenduvus, pH, püsivus, kemikaaliklass, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimise seisukohast;

uuritava aine / kontrollaine töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (näiteks soojendamine, peenestamine);

püsivus, kui on teada.

##### *Teave sponsori ja uurimisasutuse kohta*

sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

silmade päritolu kirjeldus (näiteks asutus, milles need koguti);

silmade säilitamis- ja transporditingimused (näiteks silmade kogumise aeg, ajavahemik kogumisest katse alguseni);

silmade kogumiseks kasutatud lindude eritunnused, kui on teada (näiteks lindude vanus, sugu, mass).

##### *Kasutatud meetodi ja katse-eeskirja põhjendus*

##### *Katsemeetodi õigsus*

Kasutatud katsemeetodi ajast sõltumatu õigsuse (st täpsuse ja usaldusväärsuse) tagamise meetod (s.o ained, millega katse läbiviimise oskust teatava ajavahemiku järel kontrollitakse, varasemate negatiivse ja positiivse kontrolli andmete kasutamine).

*Katse kõlblikkuse kriteeriumid*

võimaluse korral varasematel andmetel põhinevad kõlblike paralleelsete võrdlustulemuste vahemikud.

*Katse tingimused*

kasutatud katsesüsteemi kirjeldus;

kasutatud pilulamp-mikroskoop (näiteks mudel);

kasutatud pilulamp-mikroskoobi seaded;

kasutatud kanasilmi käsitlev teave, seejuures nende kvaliteetsuse kinnitused;

kasutatud katsemeetodi üksikasjad,

uuritavate ainete kasutatud kontsentratsioonid;

kõikide katsemetoodikas tehtud muudatuste kirjeldus;

viide varasematele mudeli andmetele (näiteks negatiivse ja positiivse kontrolli ained, katse läbiviimise oskuse kontrollimiseks kasutatud ained, võrdlusained);

kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus.

*Tulemused*

muude täheldatud toimete kirjeldus;

vajaduse korral silmade fotod.

*Tulemuste arutelu**Kokkuvõte***KIRJANDUS**

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006. ELT L 353, 31.12.2008, lk 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Vt

[[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. Vt

[[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. Vt

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

- (6) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaalamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 396, 30.12.2006, lk 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Vt  
[[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. In: 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. Vt  
[[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. Vt  
[[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). Vt  
[<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. Vt  
[<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. Vt  
[[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. Vt  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]
-



## 1. liide

## MÕISTED

**Täpsus:** katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. See on katsemeetodi kasutuskõlblikkuse üks näitajaid ja üks nn asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse sageli vaheldumisi sõnaga „kooskõla”, mis tähendab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu.

**Võrdlusaine:** aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritavate ainetega; iii) teadaolevad füüsilised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitavas mõju tugevuse vahemikus.

**Sarvkest:** silmamuna eespoolses osas asuv läbipaistev kest, mis katab vikerkesta ja silmaava ning laseb valgusel tungida silma sisse.

**Sarvkesta hägusus:** suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva hägustumise määra. Sarvkesta hägususe suurenemine näitab sarvkesta kahjustuse suurust.

**Sarvkesta turse:** ICE-katse puhul objektiivselt mõõdetav suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva sarvkesta paisumise määra. See väljendatakse protsendina ja arvutatakse ICE-katses enne töötlemist mõõdetud sarvkesta paksuse ja pärast uuritava ainega kokkupuudet korrapärase ajavahemike järel mõõdetud sarvkesta paksuse andmetest. Sarvkesta turse ulatus näitab sarvkesta kahjustuse suurust.

**EPA I kategooria:** söövitus (silmakoe pöördumatu kahjustus) või sarvkesta mõjutus või ärritus, mis püsib rohkem kui 21 päeva (1).

**ELi kategooria R41:** koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (2).

**Valenegatiivsete vastuste määr:** kõikide selliste positiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud negatiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

**Valepositiivsete vastuste määr:** kõikide selliste negatiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud positiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

**Fluorestsiini peetumine:** ICE-katse puhul subjektiivselt hinnatav suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva naatriumfluorestsiini epiteelirakkudes peetumise määra. Fluorestsiini peetumise määr näitab sarvkesta epiteeli kahjustuse suurust.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – kemikaalide ühtne ülemaailmne klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem):** süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähisteid, nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (3).

**GHSi 1. kategooria:** koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (3).

**Oht:** mõjuri või olukorra loomupärane omadus tekitada kahjustust, kui organism, süsteem või (ala-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

**Negatiivne kontroll:** uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi töödeldakse koos proovidega, mida mõjutatakse uuritava ainega, ja koos muude kontrollproovidega, et kontrollida, ega lahusti ei mõjuta katsesüsteemi.

**Ärritust mitte põhjustav aine:** aine, mida ei ole klassifitseeritud EPA I, II ega III kategooriasse, ELi kategooriatesse R41 või R36 ega GHSi 1., 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silmaärritajaks (1), (2), (3).

**Silma söövitav aine:** a) aine, mis põhjustab silma kudede pöördumatut kahjustust; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

**Silma ärritav aine:** a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silmas pöörduva muutuse; b) aine, mis on klassifitseeritud EPA II või III kategooriasse, ELi kategooriasse R36 või GHSi 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silmaärritajaks (1), (2), (3).

**Silma tugevasti ärritav aine:** a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silmas kudede kahjustuse, mis ei ole pöörduv 21 päeva jooksul, või põhjustab tugeva füüsilise nägemislanguse; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

**Positiivne kontroll:** paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse ainega, mis teadaolevalt põhjustab positiivse tulemuse. Selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur.

**Usaldusväärsus:** sellega mõõdetakse katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katseprotokolli alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Seda hinnatakse laborisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse ja laborisese korratavuse arvutamiseega.

**Pilulamp-mikroskoop:** seade, mida kasutatakse silma otseseks vaatluseks; binokulaarmikroskoobiga saadakse suurendatud vertikaalne stereoskoopiline kujutis. ICE-katses kasutatakse seda seadet kanasilma eespoolsete struktuuride vaatlemiseks, samuti sarvkesta paksuse objektiivseks mõõtmiseks, kasutades lisaseadet – paksusemõõtjat.

**Lahusti/pealekandmisvahendi kontroll:** uuritava ainega töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või pealekandmisvahendit; sellist proovi töödeldakse sarnaselt uuritava ainega töödeldud proovile ja muudele kontrollproovidele, et määrata kindlaks samas lahustis või pealekandmisvahendis lahustatud uuritava ainega töödeldud proovide nulljoonetase. Kui paralleelselt katsetatakse negatiivse kontrolli proovi, siis näitab lahusti/pealekandmisvahendi proov ka seda, kas lahusti või pealekandmisvahend mõjutab katsesüsteemi.

**Astmeline katsetamine:** samm-sammulise katsetamise strateegia, milles enne järgmise etappi minekut vaadatakse kindlaksmääratud korras läbi kogu uuritava aine kohta olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et määrata kindlaks, kas on piisavalt teavet riskirühma klassifitseerimise otsuse tegemiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab uuritava aine ärritavate omaduste kohta otsuse teha, ei ole edasisi katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa teha otsust uuritava aine ärritavate omaduste kohta, jätkatakse samm-sammult järjestikuste loomkatsete tegemist, kuni aine saab üheselt klassifitseerida.

**Valideeritud katsemeetod:** katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul.

**Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine:** protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni aine võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

## 2. liide

## ICE-KATSE VALDAMISE KONTROLLIMISEKS SOOVITATAVAD KEMIKAALID

Enne käesoleva katsemeetodi kohase katsemeetodi tavakasutusse võtmist võivad laborid soovida tõendada meetodi tehnilist valdamist ja määrata selleks õigesti tabelis 1 soovitatud 10 aine klassifikatsioon söövitava toime järgi. Kõnealused ained on valitud nii, et oleks esindatud silma paikse ärrituse/söövituse põhjustamise kogu skaala, mis põhineb küüliku silmaga *in vivo*-katsetes (TG 405) saadud tulemustel (st 1., 2.A ja 2.B kategooria või ÜRO GHSi kohaselt „klassifitseerimata ja märgiseta“) (3), (7). Pidades aga silmas kõnealuste katsete valideeritud kasulikkust (tehakse kindlaks vaid silma söövitavad või tugevasti ärritavad ained), on meetodi valdamise tõendamisel tegemist vaid kahe suguste tulemustega klassifitseerimise seisukohast (söövitav/tugevasti ärritav või mittesöövitav/silma mitte tugevasti ärritav). Muud valikukriteeriumid olid järgmised: ained peaksid olema kaubanduses saadaval ja nende kohta peaksid olema kvaliteetsed *in vivo*-võrdlusandmed ning on olemas kvaliteetsed andmed, mis on määratud kahe *in vitro*-meetodiga, mille jaoks on välja töötatud katse läbiviimise suunised. Seepärast valiti ärritavad ained 122 võrdlusaine nimestikust, mida ICCVAM soovib kasutada silma toksilisuse *in vitro*-katsete valideerimiseks (vt H liide: ICCVAMi soovitatud võrdlusained) (4). Võrdlusandmeid on esitatud ka ICCVAMi taustülevaatedokumentides veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse meetodi (BCOP-katse) ja ICE-katsemeetodi jaoks (18), (19).

Tabel 1

Soovitatavad ained ICE-meetodi tehnilise valdamise tõendamiseks

Ühend	CASi nr	Ühendiklass ( <sup>1</sup> )	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> -klassifikatsioon ( <sup>2</sup> )	<i>In vitro</i> -klassifikatsioon ( <sup>3</sup> )
Bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Kloorheksidiin	55-56-1	Amiin, amidiin	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Dibensoüül-L-viinhape	2743-38-6	Karboksüülhappe ester	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Imidasool	288-32-4	Heterotsükkel	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Trikloroäädikhape (30 %)	76-03-9	Karboksüülhappe	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
2,6-diklorobensoüülkloriid	4659-45-4	Atsüülhaliid	Vedel	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Etüül-2-metüülatsetaat	609-14-3	Ketoon, ester	Vedel	2.B kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Ammooniumnitraat	6484-52-2	Anorgaaniline sool	Tahke	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Glütserool	56-81-5	Alkohol	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
n-heksaan	110-54-3	Atsükliline süsivesinik	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number.

(<sup>1</sup>) Kemikaaliklass on igale uuritavale ainele omistatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniaraamatu-kogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (vt <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

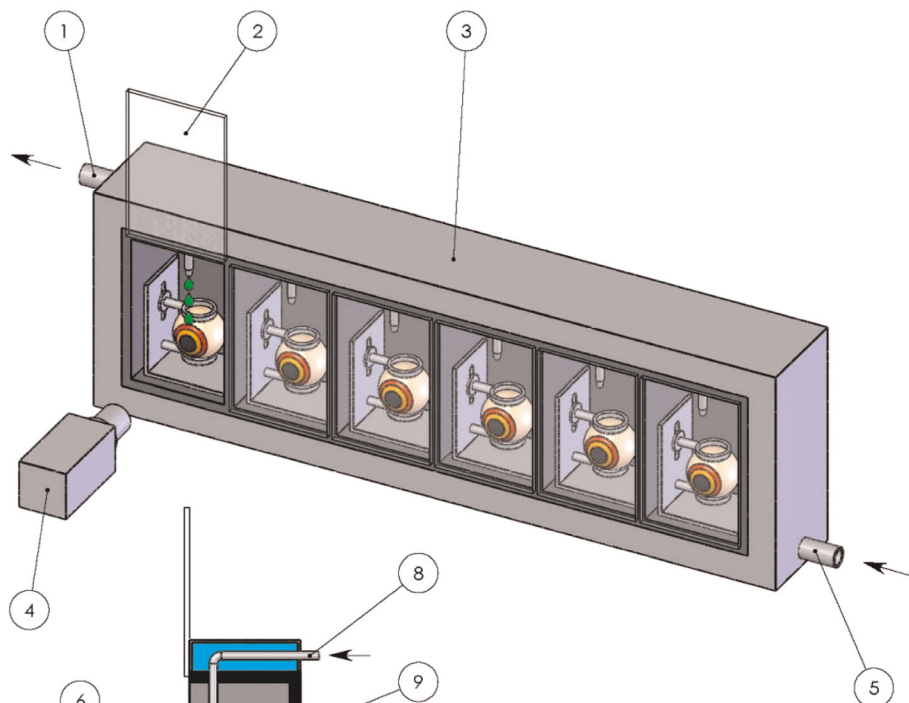
(<sup>2</sup>) Vastavalt küüliku silma *in vivo*-katse (OECD TG 405) tulemustele ja kasutades ÜRO GHSi süsteemi (3), (7).

(<sup>3</sup>) Vastavalt BCOP-katse ja ICE-katse tulemustele.

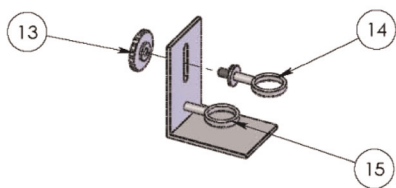
## 3. liide

**ICE-katses kasutatava tilgutusaparaadi ja silmahoidja skeem**

(Tilgutusaparaadi ja silmahoidja üldise täiendava kirjelduse on esitanud Burton et al. (17))



KAMBRI LÄBILÕIGE



SILMAHOIDJA

NR	KIRJELDUS
1	SOOJA VEE VÄLJAVOOLUTORU
2	LÜKANDLUUK
3	TILGUTUSAPARAAT
4	OPTILINE MÕÕTEINSTRUMENT
5	SOOJA VEE SISSEVOOLUTORU
6	FÜSIOLOOGILINE KEEDUSOOLALAHUS
7	SOE VESI
8	FÜSIOLOOGILISE SOOLALAHUSE SISSEVOOLUTORU
9	KAMBER
10	SILMAHOIDJA
11	KANASILM
12	SOOLALAHUSE VÄLJAVOOLUTORU
13	FIKSEERIMISKRUVI
14	REGULEERITAVA KÕRGUSEGA ÜLEMINE HAAR
15	FIKSEERITUD ALUMINE HAAR