

32010R1152

9.12.2010.

SLUŽBENI LIST EUROPSKE UNIJE

L 324/13

UREDBA KOMISIJE (EU) br. 1152/2010**od 8. prosinca 2010.****o izmjeni Uredbe (EZ) br. 440/2008 o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH), s ciljem njezinog prilagođavanja tehničkom napretku****(Tekst značajan za EGP)**

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 1907/2006 od 18. prosinca 2006. Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i Direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 13. stavak 3.,

budući da:

- (1) Uredba Vijeća (EZ) br. 440/2008 ⁽²⁾ sadrži ispitne metode za potrebe određivanja fizikalno-kemijskih svojstava, toksičnosti i eko-toksičnosti tvari za potrebe Uredbe (EZ) br. 1907/2006.
- (2) Uredbu Vijeća (EZ) br. 440/2008 trebalo bi ažurirati da bi se u nju uvrstile prvenstveno dvije nove metode koje je OECD nedavno usvojio za *in vitro* ispitivanje nadražujućeg djelovanja na oči s ciljem smanjivanja broja

životinja koje se koriste u eksperimentalne svrhe, u skladu s Direktivom Vijeća 86/609/EEZ od 24. studenoga 1986. o usklađivanju zakona i drugih propisa država članica o zaštiti životinja koje se koriste u pokusne i druge znanstvene svrhe ⁽³⁾. Zainteresirane strane dale su svoje mišljenje o tom prijedlogu.

- (3) Uredbu (EZ) br. 440/2008 stoga bi trebalo izmijeniti u skladu s tim.
- (4) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Odbora osnovanog na temelju članka 133. Uredbe (EZ) br. 1907/2006,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

U dijelu B Priloga Uredbi (EZ) br. 440/2008 dodaju se poglavlja B.47. i B.48. kako su navedena u Prilogu ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu trećeg dana nakon objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 8. prosinca 2010.

Za Komisiju
Predsjednik
José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ SL L 396, 30.12.2006., str. 1.

⁽²⁾ SL L 142, 31.5.2008., str. 1.

⁽³⁾ SL L 358, 18.12.1986., str. 1.

PRILOG

„B. 47. METODA ISPITIVANJA ZAMUĆENJA I PROPUSNOSTI GOVEĐE ROŽNICE ZA IDENTIFIKACIJU TVARI NAGRIZAJUĆIH I JAKO NADRAŽUJUĆIH ZA OČI

UVOD

1. Metoda ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice (Bovine Corneal Opacity and Permeability - BCOP) je *in vitro* ispitna metoda koja se u određenim okolnostima i uz konkretna ograničenja može primijeniti za razvrstavanje tvari i mješavina kao 'tvari nagrizaćućih i jako nadražujućih za oči' (1) (2) (3). U smislu ove ispitne metode, jako nadražujuće tvari definirane su kao tvari koje izazivaju okularne lezije koje kod zečeva traju najmanje 21 dan nakon primjene tvari. Iako se ne smatra da vrijedi kao potpuna zamjena za *in vivo* test na očima zečeva, BCOP metoda preporučuje se za primjenu kao dio strategije stupnjevanog ispitivanja za regulatorno razvrstavanje i označivanje u okviru konkretne domene primjenjivosti (4) (5). Ispitne tvari i mješavine (6) mogu se bez dodatnog testiranja na zečevima razvrstati kao tvari nagrizaćuje i jako nadražujuće za oči. Tvar koja daje negativan rezultat na testu trebalo bi testirati na zečevima strategijom sekvencijskog ispitivanja kako je opisana u Smjernici za ispitivanje OECD-a 405 (7) (poglavlje B. 5 ovog Priloga).
2. Svrha ove ispitne metode je opisati postupke koji se koriste za ocjenjivanje potencijalno nagrizaćućeg ili jako nadražujućeg djelovanja ispitne tvari, koje se mjeri sposobnošću te tvari da izazove zamućenje i povećanu propusnost izolirane goveđe rožnice. Toksički učinci na rožnicu mjere se: i. smanjenim prijenosom svjetla (zamućenje) i ii. povećanim prolazom boje natrijevog fluoresceina (propusnost). Procjene zamućenja i propusnosti rožnice nakon izlaganja ispitnoj tvari kombiniraju se kako bi se dobio nalaz nadraživanja *in vitro* - In Vitro Irritancy Score (IVIS), koji se koristi za razvrstavanje ispitne tvari prema razini nadražujućeg djelovanja.
3. Primjenom BCOP ispitne metode ispitane su i tvari nadražujuće za oči koje uzrokuju lezije koje se povuku za manje od 21 dan i nenadržujuće tvari. Međutim, točnost i pouzdanost BCOP ispitne metode za tvari u tim kategorijama nisu formalno ocijenjene.
4. Definicije su dane u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

5. Ova ispitna metoda temelji se na protokolu BCOP ispitne metode Međuagencijskog koordinacijskog odbora za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM) (8) koji je razvijen prema međunarodnoj validacijskoj studiji (4) (5) (9), uz doprinose iz Europskog centra za validaciju alternativnih metoda (ECVAM) i Japanskog centra za validaciju alternativnih metoda (JaCVAM). Protokol se zasniva na podacima dobivenim od Instituta za *in vitro* znanosti (IIVS) i INVITTOX protokolu 124 (10) kao protokolu koji je upotrijebljen za predvalidacijsku studiju BCOP pokusa provedenu 1997.-1998. pod pokroviteljstvom Europske zajednice. Oba ta protokola temelje se na metodologiji BCOP pokusa o kojoj su prvi izvijestili Gautheron *et al.* (11).
6. Identificirana ograničenja ove ispitne metode temelje se na visokim stopama lažno pozitivnih rezultata za alkohole i ketone i visokoj stopi lažno negativnih rezultata za krute tvari, primijećenih u validacijskoj bazi podataka (vidjeti stavak 44.) (5). Ako se tvari u tim kemijskim i fizikalnim kategorijama isključe iz baze podataka, točnost metode BCOP u sustavima za razvrstavanje EU-a, EPA-e i GHS sustavu bitno je bolja. Na temelju svrhe ovog pokusa (tj. identifikacije samo onih tvari koje su nagrizaćuje i jako nadražujuće za oči), stopa lažno negativnih rezultata nije od presudne važnosti jer te tvari treba sekvencijski testirati na zečevima ili drugim odgovarajuće validiranim *in vitro* testovima u zavisnosti od regulatornih zahtjeva, primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja i pristupa ocjenjivanja dokazne snage. Nadalje, postojeća validacijska baza podataka nije omogućivala odgovarajuće ocjenjivanje nekih kategorija kemikalija ili proizvoda (npr. mješavine). Ispitivači bi ipak mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode za ispitivanje svih vrsta materijala (uključujući i mješavine), a pozitivan bi se rezultat mogao prihvatiti kao pokazatelj nagrizaćuje ili jako nadražujuće reakcije za oči. Međutim, pozitivne rezultate dobivene s alkoholima treba oprezno tumačiti zbog rizika postizanja precijenjenih rezultata.
7. Kod svih postupaka s goveđim očima i goveđim rožnicama treba poštovati važeće propise ispitnog laboratorija i postupke za rukovanje materijalom dobivenim od životinja koji obuhvaća ali se ne ograničava na tkiva i tkivne tekućine. Preporučuju se općenite mjere opreza za laboratorije (12).
8. Ograničenje ove ispitne metode je u tome da, iako se u njoj uzimaju u obzir učinci na oči ocijenjeni metodom ispitivanja nadražujućeg djelovanja na oči kod zečeva i u određenom stupnju jačina tih učinaka, ne razmatraju se ozljede konjunktive i šarenice. Isto tako, iako se reverzibilnost oštećenja rožnica ne može *per se* ocijeniti pokusom BCOP, na temelju studija na očima zečeva predloženo je da se za razlikovanje ireverzibilnih i reverzibilnih učinaka može koristiti procjena inicijalne dubine oštećenja rožnice (13). I konačno, BCOP metoda ne omogućuje procjenu potencijala sustavne toksičnosti koja se povezuje s izlaganjem oka.

9. I dalje se nastoji dodatno okarakterizirati koristi i ograničenja pokusa BCOP za identifikaciju tvari koje nisu jako nadražujuće ili uopće nisu nadražujuće (vidjeti također stavak 45.). Korisnike se isto tako potiče da organizacijama za validaciju dostave uzorke i/ili podatke za formalno ocjenjivanje mogućih budućih primjena BCOP ispitne metode i za tvari koje nisu jako nadražujuće ili uopće nisu nadražujuće.
10. U svakom laboratoriju koji po prvi put provodi ovaj pokus treba koristiti set odobrenih kemikalija naveden u Dodatku 2. Laboratorij može koristiti te kemikalije kako bi dokazao svoju tehničku osposobljenost za provođenje BCOP ispitne metode prije nego podatke iz BCOP testa dostavi za razvrstavanje prema stupnju opasnosti u regulatorne svrhe.

NAČELO ISPITIVANJA

11. BCOP ispitna metoda je organotipski model koji kratkoročno osigurava održavanje normalne fiziološke i biokemijske funkcije goveđe rožnice *in vitro*. U ovoj ispitnoj metodi, oštećenje koje uzrokuje ispitna tvar procjenjuje se kvantitativnim mjerenjima promjene zamućenja i propusnosti rožnice pomoću opacimetra odnosno spektrofotometra vidljivog svjetla. Oba mjerenja koriste se za izračun IVIS-a koji se upotrebljava kako bi se *in vitro* utvrđena kategorija razvrstavanja prema opasnosti nadraživanja mogla iskoristiti za *in vivo* procjenu potencijala neke ispitne tvari da nadraži oko (vidjeti „Kriterije za donošenje odluke”).
12. U BCOP ispitnoj metodi koriste se izolirane rožnice iz očiju svježe zaklane stoke. Zamućenje rožnice mjeri se kvantitativno kao količina prijenosa svjetla kroz rožnicu. Propusnost se mjeri kvantitativno kao količina boje natrijevog fluoresceina koja prolazi punom debljinom rožnice, kako je detektirana u sredini stražnje komore. Ispitne tvari nanose se na epitelnu površinu rožnice u prednjoj komori držača rožnice. U Dodatku 3. dat je opis i shematski prikaz držača rožnice koji se koristi kod BCOP metode. Ti se uređaji mogu komercijalno nabaviti iz različitih izvora ili se mogu izraditi.

Izvor i starost goveđih očiju i odabir životinjskih vrsta

13. Stoka koja se šalje u klaonicu obično se kolje bilo za ljudsku potrošnju ili za druge komercijalne svrhe. Samo zdrave životinje koje se smatraju pogodnim za uvrštavanje u lanac ljudske prehrane koriste se kao izvor rožnica koje se upotrebljavaju u BCOP metodi. Budući da stoka varira u težini ovisno o pasmini, starosti i spolu, ne navodi se preporučena težina životinje u vrijeme klanja.
14. Kada se koriste oči životinja različite starosti, može doći do varijacija u dimenzijama rožnica. Rožnice horizontalnog promjera $> 30,5$ mm i vrijednosti debljine srednjeg dijela rožnice (CCT) $\geq 1\,100$ μm obično se dobiju od stoke starije od osam godina, dok se horizontalni promjer $> 28,5$ mm i CCT ≥ 900 μm obično dobiju od stoke mlađe od pet godina (14). Iz tog razloga, oči stoke starije od 60 mjeseci obično se ne koriste. Oči stoke mlađe od 12 mjeseci obično se ne koriste jer su one još u razvoju pa su debljina i promjer rožnice znatno manji nego kod odrasle stoke. Međutim, upotreba rožnice mladih životinja (tj. 6 do 12 mjeseci starosti) dozvoljena je budući da ima nekih prednosti, kao što su veća dostupnost, uži raspon starosti i manje opasnosti povezane s potencijalnom izloženosti radnika goveđoj spongiformnoj encefalopatiji (15). Budući da bi dodatno ocjenjivanje učinka veličine i debljine rožnice na osjetljivost na nagrizajuće i nadražujuće tvari bilo korisno, korisnike se potiče da za životinje od kojih se uzima rožnica koja se koristi u studiji navedu približnu dob i/ili težinu.

Prikupljanje i prijevoz očiju u laboratorij

15. Oči prikupljaju radnici u klaonici. Kako bi se mehanička i druga oštećenja očiju svela na minimum, oči treba enukleirati što je moguće brže nakon što je životinja usmrćena. Kako bi se izbjegla izloženost očiju potencijalno nadražujućim tvarima, kod ispiranja glave životinje radnici u klaonici ne bi trebali koristiti sredstva za pranje.
16. Oči treba potpuno potopiti u Hankovu otopinu (Hanks' Balanced Salt Solution = HBSS) u odgovarajuće dimenzioniranom spremniku i prevesti do laboratorija pazeći da ne dođe do oštećenja i/ili bakteriološke kontaminacije. Budući da se oči prikupljaju tijekom postupka klanja, mogu biti izložene krvi i drugim biološkim tvarima, uključujući i bakterije i druge mikroorganizme. Stoga je važno osigurati da rizik kontaminacije bude minimalni (npr. spremnik s očima treba držati na mokrom ledu, otopini HBSS u kojoj se oči skladište tijekom transporta treba dodati antibiotike [npr. 100 IU/mL penicilina i 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina]).
17. Vrijeme između prikupljanja očiju i upotrebe rožnica u BCOP testu treba biti što kraće (obično se koriste u istom danu u kojem su prikupljene) i treba dokazati da se njime ne dovodi u pitanje vjerodostojnost rezultata ispitivanja. Ti rezultati ovise o kriterijima odabira očiju kao i reakcijama pozitivnih i negativnih kontrola. Sve oči koje se upotrebljavaju u testu trebaju biti iz iste skupine očiju prikupljenih određenog dana.

Kriteriji za odabir očiju koje se koriste u metodi BCOP

18. Kada stignu u laboratorij, oči se odmah pažljivo pregledaju kako bi se utvrdili eventualni nedostaci, poput povećanog zamućenja, ogrebotina i neovaskularizacije. Treba upotrijebiti samo one oči koje nemaju takvih oštećenja.
19. Kvaliteta svake rožnice ocjenjuje se i u kasnijim fazama pokusa. Rožnice koje imaju zamućenje veće od sedam jedinica zamućenja (NAPOMENA: Opacimeter treba biti umjeren prema normama zamućenja koje se koriste za utvrđivanje jedinica zamućenja, vidjeti Dodatak 3.) nakon početnog jednosatnog uravnoteživanja treba odbaciti.
20. Svaka tretirana skupina (ispitna tvar, paralelne negativne i pozitivne kontrole) sadrži najmanje tri oka. Za negativnu kontrolu u pokusu BCOP treba koristiti tri rožnice. Budući da je ekscizija svih rožnica izvršena sa cijelih očnih jabučica pa su onda stavljane u komore držača rožnice, zbog tih manipulacija postoji mogućnost za artefakte u vrijednostima zamućenja i propusnosti rožnica (uključujući i negativne kontrole). Nadalje, vrijednosti zamućenja i propusnosti mjerene na negativnim kontrolnim rožnicama koriste se za korekciju vrijednosti zamućenja i propusnosti rožnice ispitnih uzoraka i tretiranih pozitivnih kontrolnih rožnica u izračunima nalaza nadraživanja *in vitro* (IVIS).

POSTUPAK**Priprema očiju**

21. Kod disekcije neoštećenih rožnica, rub od 2-3 mm sklere ostavi se za kasniju upotrebu, pazeći da se ne oštete epitel i endotel rožnice. Izolirane rožnice postavljaju se na posebno konstruirane držače tako da je prednji odjeljak u kontaktu s epitelnom stranom rožnice a stražnji s endotelnom stranom rožnice. Obje komore se do ruba pune prethodno zagrijanim medijem - Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (prvo stražnja komora) pazeći da se ne stvaraju mjehurići zraka. Uređaj se tada uravnotežuje na $32 \pm 1^\circ\text{C}$ najmanje jedan sat kako bi se rožnice uravnotežile s medijem i, koliko je to moguće, postigle normalnu metaboličku aktivnost (približna temperatura površine rožnice *in vivo* iznosi 32°C).
22. Nakon uravnoteženja, u obje komore dodaje se svježi prethodno zagrijani medij EMEM i za svaku rožnicu uzimaju se polazni podaci o zamućenju. Svaka rožnica koja pokazuje makroskopsko oštećenje tkiva (npr. ogrebotine, pigmentaciju, neovaskularizaciju) ili zamućenje > 7 jedinica zamućenja odbacuje se. Računa se srednje zamućenje svih uravnoteženih rožnica. Kao rožnice za negativnu kontrolu (ili kontrolu otapalom) izabiru se minimalno tri rožnice s vrijednostima zamućenja blizu medijan vrijednosti za sve rožnice. Preostale rožnice zatim se razdjeljuju u tretirane i pozitivne kontrolne skupine.
23. Budući da je toplinski kapacitet vode veći od toplinskog kapaciteta zraka, voda osigurava stabilnije temperaturne uvjete za inkubaciju. Stoga se za održavanje držača rožnice i njegovog sadržaja na $32 \pm 1^\circ\text{C}$ preporuča upotreba vodene kupelji. Međutim, mogu se koristiti i zračni inkubatori uz mjere opreza kako bi se održala stabilnost temperature (npr. predgrijavanjem držača i medija).

Primjena ispitne tvari

24. Za tretiranje se koriste dva različita protokola, jedan za tekućine i surfaktante (krutine ili tekućine) i jedan za krutine koje nisu surfaktanti.
25. Tekućine se ispituju nerazrijeđene dok se surfaktanti ispituju u koncentraciji od 10 % w/v u 0,9 %-tnoj otopini natrijevog klorida, destiliranoj vodi ili drugom otapalu za koje je dokazano da nema negativnih učinaka na ispitni sustav. Polu-krutine, paste i voskovi obično se ispituju kao tekućine. Za alternativne koncentracije razrjeđivanja treba navesti odgovarajuće obrazloženje. Rožnice se izlažu tekućinama ili surfaktantima u vremenu od 10 minuta. Za primjenu drugih vremena izlaganja treba dati odgovarajuće znanstveno opravdanje.
26. Površinski neaktivne krute tvari obično se ispituju kao otopine ili suspenzije u 20 %-tnoj koncentraciji u 0,9 %-tnoj otopini natrijevog klorida, destiliranoj vodi ili drugom otapalu za koje je dokazano da nema negativnih učinaka na ispitni sustav. U nekim okolnostima i uz primjereno znanstveno opravdanje, krute tvari se mogu ispitivati i čiste, izravnim nanošenjem na površinu rožnice metodom otvorene komore (vidjeti stavak 29.). Rožnice se izlažu krutim tvarima u vremenu od četiri sata, ali kao i kod tekućina i surfaktanata, alternativna vremena izlaganja moguća su uz odgovarajuće znanstveno opravdanje.
27. Mogu se upotrijebiti različite metode tretiranja u zavisnosti od agregatnog stanja i kemijskih svojstava ispitivane tvari (npr. krutine, tekućine, viskozne ili neviskozne tekućine). Od presudne je važnosti osigurati da ispitna tvar dovoljno pokriva epitelnu površinu i da se u fazama ispiranja pravilno odstrani. Za neviskozne do slabo viskozne tekuće ispitne tvari obično se koristi metoda zatvorene komore dok se metoda otvorene komore obično koristi za poluviskozne i viskozne tekuće ispitne tvari i za čiste krutine.

28. Kod metode sa zatvorenim komorom, količina ispitne tvari (750 μ L) dovoljna da pokrije epitelnu stranu rožnice uvodi se u prednju komoru kroz dozirne otvore na gornjoj površini komore koji se kasnije nepropusno zatvore čepovima dok traje izlaganje. Važno je osigurati da svaka rožnica bude izložena ispitnoj tvari u odgovarajućem vremenu.
29. Kod metode s otvorenim komorom, prije tretiranja s prednje komore se ukloni stakleni prozorčić i njegov prstenasti osigurač. Kontrolna ili ispitna tvar (750 μ L ili količina ispitne tvari koja je dovoljna da u potpunosti prekrije rožnicu) nanosi se izravno na epitelnu površinu rožnice pomoću mikropipete. Ako je ispitnu tvar teško usisati pipetom, radi preciznijeg doziranja, ispitna tvar može se pod tlakom napuniti u pipetu s pozitivnim pomakom. Vrh pipete s pozitivnim pomakom uvede se u dozirni vrh štrcaljke tako da se materijal može pod tlakom napuniti u vrh pipete. Klip štrcaljke potiskuje se istodobno s povlačenjem klipa pipete prema gore. Ako se u vrhu pipete pojave mjehurići zraka, ispitni uzorak se uklanja (izbacuje) i postupak se ponavlja dok vrh nije napunjen bez mjehurića zraka. Prema potrebi, može se koristiti obična štrcaljka (bez igle) jer ona omogućuje točno mjerenje zapremine ispitne tvari i lakše nanošenje na epitelnu površinu rožnice. Nakon doziranja, stakleni prozorčić se vraća na prednju komoru čime se ponovno dobiva zatvoreni sustav.

Inkubacija nakon izlaganja

30. Nakon razdoblja izlaganja, ispitna tvar, negativna kontrola ili pozitivna kontrolna tvar uklanja se iz prednje komore i epitel se ispiri najmanje tri puta (ili dok ne nestanu vidljivi dokazi ispitne tvari) medijem EMEM (koji sadrži fenolno crvenilo). Za ispiranje koristi se medij koji sadrži fenolno crvenilo budući da se u fenolnom crvenilu može pratiti promjena boje, čime se određuje učinkovitost ispiranja kiselih ili lužnatih materijala. Rožnice se ispiru više od tri puta ako fenolno crvenilo još nije obojeno (ako je žuto ili ljubičasto) ili ako je ispitna tvar još uvijek vidljiva. Čim u mediju više nema tvari, rožnice se završno ispiru medijem EMEM (bez fenolnog crvenila). EMEM (bez fenolnog crvenila) koristi se kao sredstvo za završno ispiranje kojim se osigurava da je prije mjerenja zamućenja fenolno crvenilo odstranjeno iz prednje komore. Prednja komora se zatim ponovno napuni svježim medijem EMEM bez fenolnog crvenila.
31. Za tekućine i surfaktante, rožnice se nakon ispiranja inkubira dodatna dva sata na 32 ± 1 °C. U određenim okolnostima može biti korisno produljiti vrijeme nakon izlaganja pa se od slučaja do slučaja može razmotriti. Rožnice tretirane krutim tvarima obilno se ispiru po isteku četverosatnog razdoblja izlaganja, ali daljnja inkubacija nije potrebna.
32. Na kraju razdoblja inkubacije nakon izlaganja za tekućine i surfaktante i na kraju četverosatnog razdoblja izlaganja za površinski neaktivne krute tvari, bilježi se zamućenje i propusnost svake rožnice. Isto tako, svaku se rožnicu vizualno promatra i relevantna opažanja se bilježe (npr. ljuštenje kože, rezidualna ispitna tvar, nejednolični obrasci zamućenja). Ta bi opažanja mogla biti važna jer se mogu odraziti kao varijacije očitavanja na opacimetru.

Kontrolne tvari

33. Svaki eksperiment obuhvaća paralelne negativne kontrole ili kontrole otapalom/nosačem i pozitivne kontrole.
34. Kada se ispituje nerazrijeđena tekuća tvar, u ispitnu metodu BCOP paralelno se uvodi negativna kontrolna tvar (npr. 0,9 %-tna otopina natrijevog klorida ili destilirana voda) kako bi se otkrile nespecifične promjene u ispitnom sustavu i dobila referentna točka za ocjenu testa. Tom se metodom isto tako jamči da se uvjetima provođenja pokusa ne izazovu neželjene reakcije nadraživanja.
35. Kada se ispituje razrijeđena tekućina, surfaktant ili kruta tvar, u ispitnu metodu BCOP paralelno se uvodi skupina za kontrolu otapalom/nosačem kako bi se dobila referentna točka za kriterije za ocjenu učinaka testa. Može se upotrijebiti samo ono otapalo/nosač koji dokazano nemaju negativnih učinaka na ispitni sustav.
36. Tvar za koju se zna da nadražuje oči uvodi se u svaki eksperiment kao paralelna pozitivna kontrolna tvar radi verifikacije da je izazvana reakcija odgovarajuća. Budući da se BCOP pokus upotrebljava kao ispitna metoda za identifikaciju nagrizajućih i jako nadražujućih tvari, idealna pozitivna kontrolna tvar trebala bi biti referentna tvar koja u toj ispitnoj metodi izaziva jaku reakciju. Međutim, kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti reakcije pozitivne kontrole tijekom vremena, jačina reakcije na nadražujuću tvar ne bi trebala biti prekomjerna.
37. Preporučuje pozitivnih kontrolnih tvari za tekuće ispitne tvari su dimetilformamid ili 1 %-tni natrijev hidroksid. Primjer pozitivne kontrolne tvari za krute ispitne tvari je 20 % (maseno volumnih) imodazola u 0,9 %-tnoj otopini natrijevog klorida.

38. Etaloni su tvari korisne za ocjenjivanje potencijala nadražujućeg djelovanja na oči nepoznatih kemikalija iz specifične kategorije kemikalija ili proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala nadražujućeg djelovanja tvari nadražujuće za oči unutar specifičnog raspona nadražujućih reakcija.

Izmjereni učinci

39. Zamućenje se određuje količinom prolaska svjetla kroz rožnicu. Zamućenje rožnice mjeri se kvantitativno pomoću opacimetra, koji daje vrijednosti zamućenja mjerene na kontinuiranoj skali.
40. Propusnost se određuje količinom boje natrijevog fluoresceina koja penetrira kroz sve slojeve stanice rožnice (tj. od epitela na vanjskoj površini rožnice do endotela na unutarnjoj površini rožnice). 1 mL otopine natrijevog fluoresceina (4 ili 5 mg/mL kada se ispituju tekuće tvari i surfaktanti ili krute tvari koje nisu površinski aktivne) dodaje se u prednju komoru držača rožnice koji je u kontaktu s epitelnom stranom rožnice dok se stražnja komora koja je u kontaktu s endotelnom stranom rožnice puni svježim medijem EMEM. Držač se zatim inkubira u vodoravnom položaju u trajanju od 90 ± 5 min na 32 ± 1 °C. Količina natrijevog fluoresceina koja prijeđe u stražnju komoru kvantitativno se mjeri UV/VIS spektrofotometrijom. Spektrofotometrijska mjerenja koja se ocjenjuju na 490 nm bilježe se kao optička gustoća (OD_{490}) ili vrijednosti apsorbancije, koje se mjere na kontinuiranoj skali. Vrijednosti propusnosti fluoresceina određuju se primjenom vrijednosti OD_{490} pomoću spektrofotometra vidljivog svjetla standardne duljine puta od 1 cm.
41. Alternativno, mikrotitrski pločasti čitač s 96 bunarića može se koristiti pod uvjetom da: i. se za određivanje OD_{490} vrijednosti fluoresceina može utvrditi linearni niz pločastog čitača; i (ii.), da se u ploči s 96 bunarića koriste uzorci fluoresceina točnog volumena kako bi se dobile OD_{490} vrijednosti ekvivalentne standardnoj duljini puta od 1 cm (za to bi moglo trebati potpuno napuniti sve bunariće na ploči [obično 360 mL]).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Ocjenjivanje podataka

42. Čim su vrijednosti zamućenja i srednje propusnosti (OD_{490}) korigirane za osnovno zamućenje i vrijednosti OD_{490} propusnosti negativne kontrolne tvari, srednje zamućenje i vrijednosti OD_{490} srednje propusnosti za svaku tretiranu skupinu treba kombinirati u empirijski izvedenoj formuli za izračun nalaza nadraživanja *in vitro* (IVIS) za svaku tretiranu skupinu kako slijedi:

$$IVIS = \text{srednja vrijednost zamućenja} + (15 \times \text{vrijednost } OD_{490} \text{ srednje propusnosti})$$

Sina *et al.* (16) izvijestili su da je ta formula izvedena tijekom internih i među-laboratorijskih istraživanja. Podaci prikupljeni za niz od 36 spojeva u multilaboratorijskom istraživanju podvrgnuti su multivarijantnoj analizi radi utvrđivanja jednadžbe koja najbolje odgovara podacima dobivenim *in vivo* i *in vitro*. Tu su analizu radili znanstvenici u dvije odvojene tvrtke, a izveli su gotovo identične jednadžbe.

43. Vrijednosti zamućenja i propusnosti također treba neovisno ocjenjivati kako bi se kroz jedan ili dva mjerena učinka utvrdilo da li ispitna tvar izazva nagrizanje ili jaku nadraženost (vidjeti 'Kriterije za donošenje odluke').

Kriteriji za donošenje odluke

44. Tvar koja izaziva $IVIS \geq 55,1$ definira se kao nagrizajuća ili jako nadražujuća tvar. Kao što je navedeno u stavku 1., ako ispitna tvar nije identificirana kao tvar koja nagrizava ili jako nadražuje oči, za razvrstavanje i označivanje treba provesti dodatna ispitivanja. BCOP ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 79 % (113/143) do 81 % (119/147), stopu lažno pozitivnih rezultata od 19 % (20/103) do 21 % (22/103) i stopu lažno negativnih rezultata od 16 % (7/43) do 25 % (10/40) u odnosu na podatke dobivene *in vivo* ispitnom metodom na očima zečeva, razvrstane prema sustavima razvrstavanja EPA-a (1), EU-a (2) ili GHS sustavu (3). Ako se iz baze podataka izbace tvari određenih kemijskih (tj. alkoholi, ketoni) ili fizičkih (tj. krutine) kategorija, točnost BCOP metode u sustavima razvrstavanja EU-a, EPA-a i GHS nalazi se u rasponu od 87 % (72/83) do 92 % (78/85), stopa lažno pozitivnih rezultata od 12 % (7/58) do 16 % (9/56) i stopa lažno negativnih rezultata od 0 % (0/27) do 12 % (3/26).
45. Čak i ako se ovim testom ispitna tvar ne razvrsta kao nagrizajuća i jako nadražujuća za oči, podaci dobiveni BCOP metodom, zajedno s podacima iz *in vivo* ispitivanja na očima zečeva ili iz odgovarajuće validiranog *in vitro* testa, mogu biti korisni za daljnje ocjenjivanje koristi i ograničenja BCOP ispitne metode za identifikaciju tvari koje nisu jako nadražujuće ili uopće nisu nadražujuće (Dokument sa smjernicama za primjenu metode ispitivanja okularne toksičnosti *in vitro* je u izradi).

Kriteriji za prihvaćanje studije

46. Test se smatra prihvatljivim ako pozitivna kontrolna tvar daje nalaz IVIS između dva standardna odstupanja postojeće povijesne srednje vrijednosti, koja se ažurira najmanje svaka tri mjeseca ili svaki put kada se u laboratorijima u kojima se testovi se provode često (tj. manje nego jednom mjesečno) provede prihvatljivi test. Reakcije negativne kontrolne tvari i kontrolnog otapala/nosača trebaju rezultirati vrijednostima zamućenja i propusnosti koje su manje od utvrđenih gornjih granica za polazne vrijednosti zamućenja i propusnosti za goveđe rožnice tretirane odgovarajućom negativnom kontrolnom tvari ili kontrolnim otapalom/nosačem.

Izvješće o ispitivanju

47. Izvješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće podatke ako su relevantni za provođenje studije:

Ispitne i kontrolne tvari

Kemijski naziv(i) kao što je strukturni naziv iz popisa Chemical Abstract Service (CAS) i ostali nazivi ako su poznati;

Broj iz popisa CAS ako je poznat;

Čistoća i sastav tvari ili mješavine (u masenim postocima), do mjere u kojoj je podatak dostupan;

Fizikalno-kemijska svojstva ispitne tvari relevantna za provođenje studije, npr. agregatno stanje, hlapljivost, pH, stabilnost, kemijska kategorija, topljivost u vodi;

Obrada ispitnih/kontrolnih tvari prije ispitivanja, ako je primjenjivo (npr. zagrijavanje, mljevenje);

Stabilnost, ako je poznata.

Podaci koji se odnose na pokrovitelja i ispitni laboratorij

Naziv i adresa pokrovitelja, ispitnog laboratorija i direktora studije;

Identifikacija dobavljača očiju (tj. pogona u kojem su prikupljene);

Uvjeti skladištenja i prijevoza očiju (npr. dan i vrijeme prikupljanja očiju, vrijeme proteklo do početka ispitivanja, prijevozna sredstva i temperaturni uvjeti, eventualno korišteni antibiotici);

Ako su dostupne, posebne karakteristike životinja od kojih su oči prikupljene (npr. dob, spol, težina životinje donora).

*Opravdanost ispitne metode i primijenjeni protokol**Integritet ispitne metode*

Postupak kojim se osigurava integritet (tj. točnost i pouzdanost) ispitne metode tijekom vremena (npr. periodično testiranje kemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti, primjena povijesnih podataka o negativnim i pozitivnim kontrolnim tvarima).

Kriteriji za prihvaćanje testa

Prihvatljiv raspon paralelnih pozitivnih i negativnih kontrolnih tvari na temelju povijesnih podataka;

Ako je primjenjivo, prihvatljiv raspon vrijednosti paralelnih kontrolnih etalona, prema povijesnim podacima.

Uvjeti ispitivanja

Opis ispitnog sustava koji se koristi;

Tip držača rožnice koji se koristi;

Podaci o umjeravanju uređaja koji se koriste za mjerenje zamućenja i propusnosti (npr. opacimetar i spektrofotometar);

Podaci o goveđim rožnicama koje se koriste, uključujući i izjave u pogledu njihove kvalitete;

Pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku;

Koncentracija/koncentracije ispitne tvari koja se koristi;

Opis eventualnih modifikacija ispitnog postupka;

Upućivanje na povijesne podatke modela (npr. negativne i pozitivne kontrole, kemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti, etaloni);

Opis kriterija koji se primjenjuju za ocjenjivanje.

Rezultati

Tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitne uzorke (npr. vrijednost zamućenja i vrijednost OD₄₉₀ i izračunani nalazi IVIS za ispitnu tvar i pozitivne i negativne kontrolne tvari i za kontrolni etalon [ako postoji], prikazani u obliku tablice uključujući, ako je primjereno, i podatke ponovljenih replika pokusa i srednju vrijednost \pm standardno odstupanje za svaki pokus);

Opis ostalih opaženih učinaka.

Diskusija o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni te stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006. SL L 353, 31.12.2008., str. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Dostupno na sljedećoj adresi:

[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. Dostupno na sljedećoj adresi:

[<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. Dostupno na sljedećoj adresi:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- (6) Uredba (EZ) br. 1907/2006 od 18. prosinca 2006. Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i Direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ. SL L 396, 30.12.2006., str. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Dostupno na sljedećoj adresi:

[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. 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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [<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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: Tijesno slaganje rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjera uspješnosti ispitne metode i jedan od aspekata „relevantnosti“. Često se koristi u značenju izraza „podudarnost“ u smislu omjera točnih ishoda ispitne metode.

Etalon: Tvar koja se koristi kao standard za usporedbu s ispitnom tvari. Etalon treba imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturnu i funkcionalnu sličnost s kategorijom tvari koja se ispituje; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. podatke koji dokazuju njegove poznate učinke i v. poznatu snagu u opsegu željenih reakcija.

Rožnica: Transparentni dio smješten s prednje strane očne jabučice koji prekriva šarenicu i zjenicu i propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

Zamućenje rožnice: Izmjereni stupanj zamućenja rožnice nakon izlaganja ispitnoj tvari. Povećano zamućenje rožnice je pokazatelj oštećenja rožnice. Zamućenje se može ocjenjivati subjektivno kao što se to radi u Draizovom testu na zečjem oku ili objektivno pomoću instrumenta, npr. 'opacimetra'.

Propusnost rožnice: Kvantitativno izmjereno oštećenje epitela rožnice određivanjem količine boje natrijevog fluoresceina koja prolazi kroz sve slojeve stanice rožnice.

EPA Kategorija 1: Nagrizajući učinak (ireverzibilna destrukcija očnog tkiva) ili komplikacija rožnice ili nadraženosť koji traju dulje od 21 dan (1).

EU Kategorija R41: Pojava oštećenja očnog tkiva ili teško fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitne tvari na prednjoj površini oka koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene (2).

Stopa lažno negativnih rezultata: Omjer svih pozitivnih tvari koje su ispitnom metodom lažno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: Omjer svih negativnih tvari koje su ispitnom metodom lažno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija: Sustav predlaganja razvrstavanja kemikalija (tvari i mješavina) prema standardiziranim tipovima i razinama fizičkih opasnosti, opasnosti za zdravlje i opasnosti za okoliš koji obuhvaća i odgovarajuće komunikacijske elemente kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i liste sigurnosnih podataka kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima s ciljem zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i osoblje na hitnim intervencijama) i okoliša (3).

GHS Kategorija 1: Pojava oštećenja očnog tkiva ili teško fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitne tvari na prednjoj površini oka koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene (3).

Opasnost: Intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal da uzrokuju štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Nalaz nadraživanja *in vitro* (IVIS): Empirijski izvedena formula upotrijebljena u BCOP pokusu u kojoj se srednje vrijednosti zamućenja i srednje vrijednosti propusnosti za svaku tretiranu skupinu kombiniraju u jedan *in vitro* nalaz za svaku tretiranu skupinu. $IVIS = \text{srednja vrijednost zamućenja} + (15 \times \text{srednja vrijednost propusnosti})$.

Negativna kontrola: Netretirana replika koja sadrži sve komponente ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima koji se tretiraju ispitnom tvari i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

Nenadražujuća tvar: Tvari koje nisu razvrstane kao tvari nadražujuće za oči EPA Kategorije I., II. ili III.; EU Kategorije R41 ili R36; ili GHS Kategorije 1., 2.A ili 2.B.

Tvar nagrizajuća za oči: (a) Tvar koja uzrokuje ireverzibilno oštećenje očnog tkiva; (b) Tvari koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči GHS Kategorije 1., EPA Kategorije I. ili EU Kategorije R41 (1) (2) (3).

Tvar nadražujuća za oči: (a) Tvar koja nakon primjene na prednju površinu oka dovodi do reverzibilne promjene u oku; (b) Tvari koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči EPA Kategorije II. ili III., EU Kategorije R36 ili GHS Kategorije 2.A ili 2.B (1) (2) (3).

Tvar jako nadražujuća za oči: (a) Tvar koja nakon primjene na prednju površinu oka uzrokuje oštećenje očnog tkiva koje nije reverzibilno unutar 21 dan od primjene ili uzrokuje ozbiljno fizičko pogoršanje vida. (b) Tvari koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči GHS Kategorije 1., EPA Kategorije I. ili EU Kategorije R41 (1) (2) (3).

Opacimetar: Instrument koji se koristi za mjerenje 'zamućenja rožnice' kvantitativnim ocjenjivanjem prijenosa svjetla kroz rožnicu. Tipični instrument ima dva odjeljka, svaki s vlastitim izvorom svjetla i fotočelijom. Jedan odjeljak koristi se za tretiranu rožnicu, a drugi za umjeravanje instrumenta i podešavanje na nulu. Svjetlo iz halogene svjetiljke šalje se kroz kontrolni odjeljak (prazna komora bez prozorčića ili tekućina) na fotočeliju i uspoređuje sa svjetlom koje se šalje na fotočeliju kroz odjeljak za pokus u kojem je smještena komora s rožnicom. Uspoređuje se razlika u prijenosu svjetla s fotočelijom, a numerička vrijednost zamućenja prikazuje se na digitalnom displeju.

Pozitivna kontrola: Replika koja sadrži sve komponente ispitnog sustava i tretirana je tvari za koju se zna da izaziva pozitivnu reakciju. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti reakcije pozitivne kontrole tijekom vremena, reakcija ne bi trebala biti prejaka.

Pouzdanost: Stupanj mjerne obnovljivosti provedene ispitne metode koji se može postići u jednom ili između više laboratorija, tijekom vremena i uz primjenu istog protokola. Procjenjuje se izračunom intra i inter-laboratorijske mjerne obnovljivosti i intra-laboratorijske ponovljivosti.

Kontrola otapalom/nosačem: Netretirani uzorak koji sadrži sve komponente ispitnog sustava, uključujući i otapalo ili nosač, koji se obrađuje s uzorcima tretiranim ispitnom tvari i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdila polazna reakcija za uzorke koji se tretiraju ispitnom tvari otopljenoj u istom otapalu ili nosaču. Kada se testira s paralelnom negativnom kontrolom, ovaj uzorak također dokazuje jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Stupnjevano testiranje: Strategija testiranja korak po korak u kojoj se svi postojeći podaci o ispitnoj tvari pregledavaju po točno utvrđenom redu, s tim da se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak ocjenjivanja dokazne snage kako bi se odredilo ima li dovoljno podataka da se donese odluka o razvrstavanju tvari kao opasne. Ako se na temelju postojećih podataka ispitnoj tvari može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje testiranje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih podataka ispitnoj tvari ne može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, korak po korak provodi se sekvencijski postupak testiranja na životinjama dok razvrstavanje ne bude nedvosmisleno utvrđeno.

Validirana ispitna metoda: Ispitna metoda za koju su provedene validacijske studije kojima je utvrđena relevantnost (uključujući i točnost) i pouzdanost za specifičnu svrhu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda ne mora biti dostatno uspješna u smislu točnosti i pouzdanosti da bi se smatrala prihvatljivom za predloženu svrhu.

Ocjenjivanje dokazne snage: Postupak razmatranja snage i slabosti raznih podataka u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti neke tvari.

Dodatak 2.

Kemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti za BCOP ispitnu metodu

Prije rutinske primjene ispitne metode koja odgovara ovoj ispitnoj metodi, laboratoriji možda žele dokazati tehničku osposobljenost tako da za 10 tvari preporučenih u Tablici 1. točno identificiraju kategoriju nagrizajućeg djelovanja na oči. Te su tvari tako izabrane da predstavljaju niz reakcija na lokalno nadraživanje/nagrizanje očiju koje se temelje na rezultatima *in vivo* testa na očima zečeva (TG 405) (tj. Kategorije 1., 2.A, 2.B ili 'Nije razvrstano ni označeno' prema sustavu GHS UN-a (3) (7)). Međutim, uzimajući u obzir da je korisnost tih pokusa validirana (samo za identifikaciju tvari s nagrizajućim/jako nadražujućim djelovanjem na oči), za dokazivanje tehničke osposobljenosti postoje samo dva ishoda testa u svrhe razvrstavanja tvari (nagrizajuća/jako nadražujuća ili nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća). Drugi kriteriji za odabir bili su da tvari budu komercijalno dostupne, da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i da postoje visokokvalitetni podaci iz dvije *in vitro* metode za koje su izrađene Smjernice za testiranje (Test Guidelines). Iz tog razloga nadražujuće tvari odabrane su s popisa od 122 referentne tvari koje ICCVAM preporučuje za validaciju *in vitro* ispitnih metoda toksičnosti za oči (vidjeti Dodatak H: Referentne tvari prema preporuci ICCVAM-a) (5). Referentni podaci dostupni su u dokumentima ICCVAM-a (*Background Review Documents*) za ispitne metode BCOP i ICE (Isolated Chicked Eye, metoda testiranja na izoliranim očima pilića) (17) (18).

Tablica 1.

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za metodu BCOP

Tvar	CAS br.	Kemijska kategorija ⁽¹⁾	Agregatno stanje	In Vivo razvrstavanje ⁽²⁾	In Vitro razvrstavanje ⁽³⁾
Benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Klorheksidin	55-56-1	Amin, Amidin	Krutina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Dibenzoil-L-vinska kiselina	2743-38-6	Karboksilna kiselina, ester	Krutina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Imidazol	288-32-4	Heterociklični	Krutina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Triklorooctena kiselina (30 %)	76-03-9	Karboksilna kiselina	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
2,6-diklorobenz-oil klorid	4659-45-4	Acil halid	Tekućina	Kategorija 2.A	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
Etil-2-metilaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Tekućina	Kategorija 2.B	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
Amonijev nitrat	6484-52-2	Anorganska sol	Krutina	Kategorija 2.A	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Tekućina	Nije označeno	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
n-Heksan	110-54-3	Ugljikovodik (aciklički)	Tekućina	Nije označeno	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar

Kratice: CAS br. = Broj iz popisa kemikalija Chemical Abstracts Service Registry

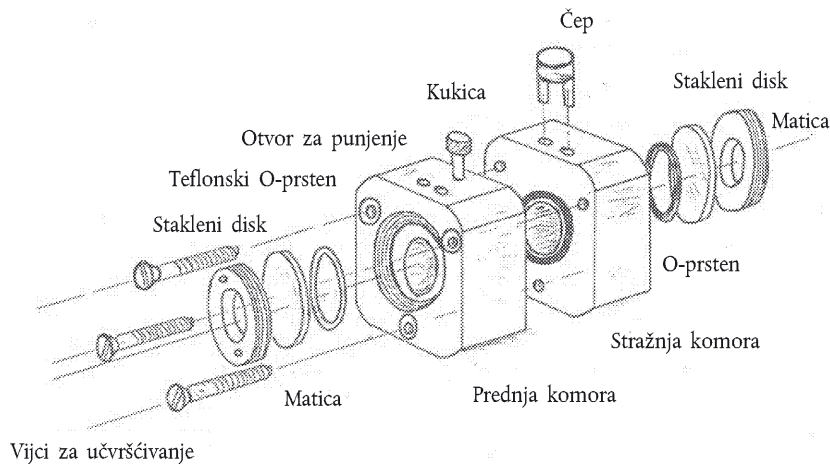
⁽¹⁾ Kemijska kategorija određena je za svaku ispitnu tvar primjenom standardnog sustava razvrstavanja koji se zasniva na sustavu razvrstavanja Medical Subject Headings (MeSH) Nacionalne medicinske biblioteke SAD-a (dostupno na adresi <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Na temelju rezultata *in vivo* testa na očima zečeva (Smjernica OECD-a za ispitivanje TG 405) i primjenom GHS UN-a (3)(7).⁽³⁾ Na temelju rezultata ispitnih metoda BCOP i ICE.

Dodatak 3.

DRŽAČ ROŽNICE ZA BCOP METODU

1. Držači rožnice za BCOP metodu izrađeni su od inertnog materijala (npr. polipropilen). Držači se sastoje od dvije polovice (prednja i stražnja komora) i imaju dvije slične cilindrične unutarnje komore. Svaka komora ima zapreminu 5 mL i završava staklenim prozorčićem kroz koji se bilježe izmjerena zamućenja. Svaka od unutarnjih komora je 1,7 cm u promjeru i 2,2 cm duboka ⁽¹⁾. O-prsten smješten na stražnjoj komori služi za sprečavanje curenja. Rožnice se postavljaju endotelnom stranom prema dolje na O-prsten stražnjih komora, a prednje komore se postavljaju na epitelnu stranu rožnica. Komore su učvršćene s tri vijka od nehrđajućeg čelika smještene na vanjskim rubovima komore. Na kraju svake komore nalazi se stakleni prozorčić koji se može skinuti radi lakšeg pristupa rožnici. Radi sprečavanja curenja, jedan O-prsten smješten je i između staklenog prozorčića i komore. Dva otvora s gornje strane svake komore omogućuju uvođenje i odstranjivanje medija i ispitnih spojeva. Za vrijeme tretiranja i inkubacije zatvaraju se gumenim čepovima.

⁽¹⁾ Navedene dimenzije su dimenzije držača rožnice koji se koristi za goveda stara 12 do 60 mjeseci. Kada se koriste životinje stare 6 do 12 mjeseci, držač treba biti tako konstruiran da svaka komora ima zapreminu 4 mL i da svaka od unutarnjih komora bude 1,5 cm u promjeru i 2,2 cm duboka. Kod svakog novo konstruiranog držača rožnice, jako je važno da omjer izložene površine rožnice i zapremine stražnje komore bude isti kao omjer kod tradicionalnog držača rožnice. To je nužno kako bi se osiguralo da vrijednosti propusnosti za izračun nalaza IVIS predloženom formulom budu točno utvrđene.



Glosar

Glass disc: Stakleni disk

PTFE-O-ring: Teflonski O-prsten

Refill: Otvor za punjenje

Hanger: Kukica

Cap: Čep

Nut: Matica

O-ring: O-prsten

Posterior compartment: Stražnja komora

Anterior compartment: Prednja komora

Fixing screws: Vijci za učvršćivanje

OPACIMETAR

- Opacimeter je uređaj za mjerenje prijenosa svjetla. Svjetlo iz halogene svjetiljke šalje se kroz kontrolni odjeljak (prazna komora bez prozorčića ili tekućina) na fotočeliju i uspoređuje sa svjetlom koje se šalje na fotočeliju kroz odjeljak za pokus u kojem je smještena komora s rožnicom. Uspoređuje se razlika u prijenosu svjetla s fotočelija, a numerička vrijednost zamućenja prikazuje se na digitalnom displeju. Utvrđuju se jedinice zamućenja.
- Opacimeter daje linearnu reakciju koja ima oblik niza očitavanja zamućenja koji obuhvaća granične vrijednosti upotrijebljene za različita razvrstavanja opisana modelom predviđanja (tj. do granične vrijednosti koja određuje nagrizajuće djelovanje/jako nadražujuće djelovanje). Kako bi se osigurala linearna i točna očitavanja do 75-80 jedinica zamućenja, opacimeter treba umjeriti pomoću serije kalibratora. Kalibratori se (neprozirne poliesterske folije) postave u komoru za kalibraciju (komora u koju se stavlja rožnica treba biti tako konstruirana da se to može učiniti) i očitava se vrijednost na opacimetru. Kalibracijska komora je tako konstruirana da kalibratori stoje na približno istoj udaljenosti između svjetla i fotočelije na koju se kod mjerenja zamućenja postavljaju rožnice. Opacimeter se najprije umjerava na 0 jedinica zamućenja tako da se kalibracijska komora koristi bez kalibratora. Zatim se u kalibracijsku komoru postave tri različita kalibratora jedan po jedan i mjere se zamućenja. Kalibratori 1, 2 i 3 trebali bi dati očitavanja zamućenja jednaka njihovim podešenim vrijednostima od 75, 150 odnosno 225 jedinica zamućenja $\pm 5\%$.

B. 48. METODA ISPITIVANJA NA IZOLIRANIM OČIMA PILIĆA ZA IDENTIFIKACIJU TVARI NAGRIZAJUĆIH I JAKO NADRAŽUJUĆIH ZA OČI**UVOD**

1. Metoda ispitivanja na izoliranim očima pilića (ICE) je *in vitro* ispitna metoda koja se u određenim okolnostima i uz konkretna ograničenja može primijeniti za razvrstavanje tvari i mješavina kao tvari nagrizaćih i jako nadražujućih za oči (1) (2) (3). U smislu ove ispitne metode, jako nadražujuće tvari definirane su kao tvari koje izazivaju okularne lezije koje kod zečeva traju najmanje 21 dan nakon primjene tvari. Iako se ne smatra potpunom zamjenom za *in vivo* test na očima zečeva, ICE metoda preporučuje se za primjenu kao dio strategije stupnjevanog ispitivanja za regulatorno razvrstavanje i označivanje u okviru konkretne domene primjenjivosti (4) (5). Ispitne tvari i mješavine (6) koje su pozitivne u ovom pokusu mogu se bez dodatnog testiranja na zečevima razvrstati kao tvari nagrizaće i jako nadražujuće za oči. Tvar koja daje negativan rezultat na testu trebat će testirati na zečevima strategijom sekvencijskog ispitivanja kako je prikazana u Smjernici za ispitivanje OECD-a 405 (7) (poglavlje B. 5 ovog Priloga).
2. Svrha ove ispitne metode je opisati postupke koji se koriste za ocjenjivanje potencijalno nagrizaćeg ili jako nadražujućeg djelovanja ispitne tvari koje se mjeri sposobnošću te tvari da izazove toksičnost u enukleiranom oku piletina. Toksički učinci na rožnicu mjere se: i. kvalitativnom procjenom zamućenja, ii. kvalitativnom procjenom oštećenja epitela zbog primjene fluoresceina na oko (retencija fluoresceina), iii. kvantitativnim mjerenjem povećane debljine (oteklina) i kvalitativnim ocjenjivanjem makroskopskog morfološkog oštećenja površine. Zamućenje rožnice, otekline i oštećenja nakon izlaganja ispitnoj tvari procjenjuju se pojedinačno, a zatim se kombiniraju radi utvrđivanja da li tvar treba razvrstati kao nadražujuću za oči.
3. ICE ispitnom metodom testirane su i tvari nadražujuće za oči koje izazivaju lezije koje nestaju u manje od 21 dan i tvari koje nisu nadražujuće. Međutim, točnost i pouzdanost ICE ispitne metode za tvari u tim kategorijama nisu formalno ocijenjene.
4. Definicije su dane u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

5. Ova ispitna metoda temelji se na protokolu ICE ispitne metode Međuagencijskog koordinacijskog odbora za validaciju alternativnih metoda (ICCVAM) (8) koji je razvijen prema međunarodnoj validacijskoj studiji (4) (5) (9), uz doprinose iz Europskog centra za validaciju alternativnih metoda, Japanskog centra za validaciju alternativnih metoda i Odsjeka za toksikologiju i primijenjenu farmakologiju organizacije 'TNO Quality of Life' (Nizozemska). Protokol se zasniva na podacima dobivenim iz objavljenih protokola kao i protokola koji organizacija TNO trenutačno koristi (10) (11) (12) (13) (14).
6. Identificirana ograničenja ove ispitne metode temelje se na postotku lažno pozitivnih rezultata za alkohole i lažno negativnih rezultata za krute tvari i surfaktante (vidjeti stavak 47.) (4). Ako se tvari u tim kemijskim i fizikalnim kategorijama isključe iz baze podataka, točnost metode ICE u sustavima za razvrstavanje EU-a, EPA-e i GHS sustavu bitno je bolja (4). Na temelju svrhe ovog pokusa (tj. identifikacije samo onih tvari koje su nagrizaće i jako nadražujuće za oči), postotak lažno negativnih rezultata nije od presudne važnosti jer se te tvari sekvencijski testiraju na zečevima ili drugim odgovarajuće validiranim *in vitro* testovima u zavisnosti od regulatornih zahtjeva, primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja i pristupa ocjenjivanja dokazne snage. Nadalje, postojeća validacijska baza podataka nije omogućivala odgovarajuće ocjenjivanje nekih kategorija kemikalija ili proizvoda (npr. mješavine). Ispitivači bi ipak mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode za ispitivanje svih vrsta materijala (uključujući i mješavine), a pozitivan bi se rezultat mogao prihvatiti kao pokazatelj nagrizaćeg ili jako nadražujućeg reakcije za oči. Međutim, pozitivne rezultate dobivene s alkoholima treba oprezno tumačiti zbog rizika postizanja precijenjenih rezultata.
7. Kod svih postupaka s očima pilića treba poštovati važeće propise ispitnog laboratorija i postupke za rukovanje materijalom dobivenim od ljudi ili životinja koji obuhvaća ali se ne ograničava na tkiva i tkivne tekućine. Preporučuju se općenite mjere opreza za laboratorije (15).
8. Ograničenje ove ispitne metode je u tome da, iako se njome uzimaju u obzir neki od učinaka na oči koji su ocijenjeni metodom ispitivanja nadražujućeg djelovanja na oči kod zečeva i u određenom stupnju jačina tih učinaka, ne razmatraju se ozljede konjunktive i šarenice. Isto tako, iako se reverzibilnost lezija rožnice ne može *per se* ocijeniti ICE ispitnom metodom, na temelju studija na očima zečeva predloženo je da se za razlikovanje ireverzibilnih i reverzibilnih učinaka može koristiti procjena inicijalne dubine oštećenja rožnice (16). I konačno, ICE ispitna metoda ne omogućuje procjenu potencijala sustavne toksičnosti koja se povezuje s izlaganjem oka.
9. I dalje se nastoji dodatno okarakterizirati koristi i ograničenja ICE ispitne metode za identifikaciju tvari koje nisu jako nadražujuće ili uopće nisu nadražujuće (vidjeti također stavak 48.). Korisnike se isto tako potiče da organizacijama za validaciju dostave uzorke i/ili podatke za formalno ocjenjivanje mogućih budućih primjena ICE ispitne metode i za tvari koje nisu jako nadražujuće za oči ili uopće nisu nadražujuće.

10. U svakom laboratoriju koji po prvi put provodi ovaj pokus treba koristiti set odobrenih kemikalija naveden u Dodatku 2. Laboratorij može koristiti te kemikalije kako bi dokazao svoju tehničku osposobljenost za provođenje ICE ispitne metode prije nego podatke iz ICE testa dostavi za razvrstavanje prema stupnju opasnosti u regulatorne svrhe.

NAČELO ISPITIVANJA

11. ICE ispitna metoda je organotipski model koji kratkoročno osigurava održavanje pilećeg oka *in vitro*. U ovoj ispitnoj metodi, oštećenje koje uzrokuje ispitna tvar procjenjuje se određivanjem oticanja rožnice, zamućenja i retencije fluoresceina. Dok posljednja dva parametra podrazumijevaju kvalitativnu procjenu, za analizu oticanja rožnice potrebna je kvantitativna procjena. Svaka se izmjera pretvara bilo u kvantitativni nalaz koji se koristi za izračun sveukupnog indeksa nadraživanja, ili joj se dodjeljuje kvalitativna kategorizacija za razvrstavanje tvari kao *in vitro* nagrizajuće ili jako nadražujuće za oči. Bilo koji od ta dva ishoda mogu se zatim upotrijebiti za predviđanje potencijala ispitne tvari za nagrizajuće i jako nadražujuće djelovanje na oči *in vivo*. (vidjeti „Kriterije za donošenje odluke”).

Izvor i starost pilećih očiju

12. Povijesno, u ovom pokusu upotrebljavaju se oči prikupljene od pilića iz klaonice gdje su usmrćeni za ljudsku prehranu, čime je eliminirana potreba za laboratorijskim životinjama. Koriste se oči samo zdravih životinja koje se smatraju pogodnim za uvrstavanje u lanac prehrane ljudi.
13. Iako nije provedena kontrolna studija za ocjenu optimalne dobi pilića, dob i težina pilića koji se povijesno upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi uobičajeni su za mlade piliće koji se tradicionalno prerađuju u klaonici peradi (tj. približno 7 tjedana stari, 1,5-2,5 kg teški).

Prikupljanje i prijevoz očiju u laboratorij

14. Glave treba odstraniti odmah nakon sedacije pilića koja se obično provodi elektrošokom i incizijom vrata radi otjecanja krvi. Treba naći lokalni izvor pilića u blizini laboratorija kako bi se pileće glave mogle prevesti iz klaonice u laboratorij dovoljno brzo da ne dođe do kvarenja i/ili bakteriološke kontaminacije. Vrijeme između prikupljanja pilećih glava i upotrebe očiju u ICE ispitnoj metodi treba biti što je moguće kraće (obično dva sata) i treba dokazati da nema utjecaja na rezultate pokusa. Ti se rezultati temelje na kriteriju odabira očiju kao i na pozitivnim i negativnim kontrolnim reakcijama. Sve oči koje se upotrebljavaju u testu trebaju biti iz iste skupine očiju prikupljene određenog dana.
15. Budući da se disekcija očiju obavlja u laboratoriju, intaktne glave prevoze se iz klaonice na temperaturi okoline u plastičnim kutijama s navlaženim ručnicima natopljenim fiziološkom otopinom.

Kriteriji za odabir očiju koje se koriste u metodi ICE

16. Oči koje imaju visoku polaznu obojanost fluoresceinom (tj. $> 0,5$) ili visok nalaz zamućenja rožnice (tj. $> 0,5$) nakon enukleacije odbacuju se.
17. Svaka tretirana skupina i paralelna pozitivna kontrola sadrži najmanje tri oka. Negativna kontrolna skupina ili skupina koja se kontrolira otapalom (ako se kao otapalo ne koristi fiziološka otopina) sadrži barem jedno oko.

POSTUPAK

Priprema očiju

18. Očni kapci oprezno se izrežu pazeći da se ne ošteti rožnica. Integritet rožnice se brzo procijeni kapljicom 2 %-tnog (w/v) natrijevog fluoresceina koji se nanese i ostavi na površini rožnice nekoliko sekundi i zatim ispere fiziološkom otopinom. Oči tretirane fluoresceinom zatim se pregleda bio-mikroskopom kako bi se provjerilo da je rožnica neoštećena (tj. da su nalazi retencije fluoresceina i zamućenja rožnice $\leq 0,5$).
19. Ako je neoštećeno, oko se zatim dalje enukleira pazeći da se ne ošteti rožnica. Očna jabučica se izvuče iz orbite, tako da se treći očni kapak čvrsto drži kirurškim forcepsom, a očni živci se prerežu zakrivljenim škarama s tupim vrhom. Važno je da se prejakim pritiskom ne ošteti rožnica (tj. treba izbjeći artefakte tlačenja).
20. Kada se oko izvadi iz orbite, na njemu treba ostati vidljiv dio očnog živca. Čim je izvađeno iz orbite, oko se stavlja na upijajući podložak i odrežu se treći kapak i ostalo spojno tkivo.

21. E nukleirano oko se stavi u stezaljku od nehrđajućeg čelika s rožnicom postavljenom vertikalno. Stezaljka se zatim prenese u komoru uređaja za superfuziju (16). Stezaljke treba tako postaviti u uređaj za superfuziju da drip fiziološke otopine zahvati cijelu rožnicu. Komore uređaja za superfuziju trebaju biti u uvjetima kontrolirane temperature na $32 \pm 1,5$ °C. U Dodatku 3. dana je shema tipskog uređaja za superfuziju i stezaljke za oči, koji se mogu komercijalno nabaviti ili izraditi. Uređaj se može prilagoditi da zadovolji potrebe pojedinih laboratorija (npr. da može primiti različiti broj očiju).
22. Nakon što su stavljene u uređaj za superfuziju, oči se ponovno pregledaju biomikroskopom kako bi se osiguralo da nisu oštećene u postupku disekcije. Za to vrijeme na apeksu rožnice treba izmjeriti i debljinu rožnice pomoću alata za mjerenje dubine na biomikroskopu. Oči s: i. nalazom retencije fluoresceina $> 0,5$; ii. zamućenjem rožnice $> 0,5$; ili iii. drugim znacima oštećenja treba zamijeniti. Za oči koje nisu odbačene zbog bilo kojeg od ovih kriterija, treba odbaciti svako oko s debljinom rožnice koja za više od 10 % odstupa od srednje vrijednosti za sve oči. Korisnike se upozorava da s različito podešenom širinom procjepa svjetiljke mikroskopa, biomikroskopi mogu dati različite izmjere debljine rožnice. Širina procjepa treba biti podešena na 0,095 mm.
23. Čim su sve oči pregledane i odobrene, oči se inkubira približno 45 do 60 minuta da se uravnoteže s ispitnim sustavom prije doziranja. Nakon uravnoteženja, za debljinu rožnice i zamućenje kao referentna izmjerena vrijednost bilježi se nula (tj. vrijeme = 0) koja služi kao polazna vrijednost. Nalaz fluoresceina utvrđen kod disekcije koristi se kao polazno mjerenje za taj kriterij ocjenjivanja.

Primjena ispitne tvari

24. Odmah nakon nultih referentnih mjerenja, oko se (u držaču) vadi iz uređaja za superfuziju, postavlja u horizontalni položaj i ispitna tvar se nanese na rožnicu.
25. Tekuće ispitne tvari obično se ispituju nerazrijeđene, ali ih se može razrijediti ako se to smatra nužnim (npr. kao dio koncepta studije). Poželjno otapalo za razrijeđene tvari je fiziološka otopina. Međutim, pod kontroliranim uvjetima mogu se koristiti i alternativna otapala, ali primjerenost drugih otapala osim fiziološke otopine treba dokazati.
26. Tekuće ispitne tvari primjenjuju se na rožnicu tako da je cijela površina rožnice jednakomjerno pokrivena ispitnom tvari; standardni volumen iznosi 0,03 mL.
27. Ako je moguće, krute tvari treba što finije zdrobiti pomoću mužara i tučka ili samljeti sličnim alatom. Prah se nanosi na rožnicu tako da je površina jednolično pokrivena ispitnom tvari; standardna količina iznosi 0,03 g.
28. Ispitna tvar (tekuća ili kruta) ostavi se djelovati 10 sekundi i zatim se ispire iz oka fiziološkom otopinom (približno 20 mL) kod temperature okoline. Oko se (u svojem držaču) zatim vraća u uređaj za superfuziju u prvobitnom uspravnom položaju.

Kontrolne tvari

29. Paralelne negativne kontrole ili kontrole otapalom/nosačem i pozitivne kontrole treba uvrstiti u svaki eksperiment.
30. Kada se ispituju nerazrijeđene tekućine ili krute tvari, kako bi se otkrile nespecifične promjene u ispitnom sustavu i osiguralo da uvjeti provođenja pokusa ne dovodu do neprimjerene reakcije nadraživanja, kao paralelna negativna kontrola u ispitnoj metodi ICE koristi se fiziološka otopina.
31. Kada se ispituju razrijeđene tekućine, u ispitnu metodu paralelno se uvodi skupina za kontrolu otapalom/nosačem kako bi se otkrile nespecifične promjene u ispitnom sustavu i osiguralo da uvjeti provođenja pokusa ne dovodu do neprimjerene reakcije nadraživanja. Kao što je navedeno u stavku 25., smije se koristiti samo otapalo/nosač za koji je dokazano da nemaju štetnih učinaka na ispitni sustav.

32. Tvar za koju se zna da nadražuje oči uvodi se u svaki eksperiment kao paralelna pozitivna kontrolna tvar radi verifikacije da je izazvana odgovarajuća reakcija. Budući da se ICE pokus upotrebljava kao ispitna metoda za identifikaciju nagrizajućih ili jako nadražujućih tvari, pozitivna kontrolna tvar trebala bi biti referentna tvar koja u toj ispitnoj metodi izaziva jaku reakciju. Međutim, kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti reakcije pozitivne kontrolne tvari tijekom vremena, jačina reakcije na nadražujuću tvar ne bi trebala biti prekomjerna. Treba proizvesti dostatne *in vitro* podatke za pozitivnu kontrolnu tvar kako bi se za pozitivnu kontrolu mogao izračunati statistički definirani prihvatljivi raspon. Ako za određenu pozitivnu kontrolnu tvar nisu dostupni odgovarajući povijesni podaci iz ICE ispitnih metoda, možda će biti potrebno provesti studije kako bi se došlo do tih podataka.
33. Primjeri pozitivnih kontrolnih tvari za tekuće ispitne tvari su 10 %-tna octena kiselina ili 5 %-tni benzalkonijev klorid, a primjeri pozitivnih kontrolnih tvari za krute ispitne tvari su natrijev hidroksid ili imidazol.
34. Etaloni su tvari korisne za ocjenjivanje potencijala nadražujućeg djelovanja na oči nepoznatih kemikalija iz specifične kategorije kemikalija ili proizvoda ili za ocjenjivanje potencijala relativnog nadražujućeg djelovanja tvari nadražujuće za oči unutar specifičnog raspona nadražujućih reakcija.

Izmjereni učinci

35. Tretirane rožnice ocjenjuju se prije tretiranja i 30, 75, 120, 180 i 240 minuta (± 5 minuta) nakon ispiranja poslije tretiranja. Ti intervali osiguravaju dovoljan broj mjerenja tijekom četverosatnog tretiranja, ostavljajući dovoljno vremena između mjerenja za propisana promatranja koja treba provesti na svim očima.
36. Izmjereni učinci koji se ocjenjuju su zamućenje i oticanje rožnice, retencija fluoresceina i morfološki učinci (tj. pojava rupica ili slabljenja epitela). Svi učinci, uz izuzetak retencije fluoresceina (koja se određuje samo prije tretiranja i 30 minuta nakon izlaganja ispitnoj tvari) određuju se u svakom od gore navedenih intervala.
37. Preporučuje se fotografijama dokumentirati zamućenje rožnice, retenciju fluoresceina, morfološke učinke i, ako je provedena, histopatologiju.
38. Nakon zadnjeg pregleda po isteku četiri sata, korisnike se potiče da oči konzerviraju u odgovarajućem fiksativu (npr. puferiranom neutralnom formalinu) za eventualnu histopatološku pretragu.
39. Oticanje rožnice određuje se mjerenjima debljine rožnice optičkim pahimetrom na biomikroskopu. Izražava se kao postotak, a izračunava se iz izmjera debljine rožnice prema sljedećoj formuli:

$$\left(\frac{\text{debljina rožnice u vremenu } t - \text{debljina rožnice u vremenu } t = 0}{\text{debljina rožnice u vremenu } t = 0} \right) \times 100$$

40. Srednji postotak oticanja rožnice za sve testirane oči izračunava se za sva vremena opažanja. Na temelju najvećeg srednjeg nalaza za oticanje rožnice bez obzira u kojem je vremenu opažanja utvrđen, dobiva se opći nalaz kategorije za svaku ispitnu tvar.
41. Za izračunavanje zamućenja rožnice uzima se najjače zamućena površina rožnice. Srednja vrijednost zamućenja rožnice za sve testirane oči izračunava se u svim vremenskim točkama opažanja. Na temelju najvećeg srednjeg nalaza zamućenja rožnice bez obzira u kojoj je vremenskoj točki opažanja utvrđen, dobiva se opći nalaz kategorije za svaku ispitnu tvar (Tablica 1.).

Tablica 1.

Nalazi zamućenja rožnice

Nalaz	Opažanje
0	Nema zamućenja
0,5	Vrlo slabo zamućenje

Nalaz	Opažanje
1	Rijetke ili difuzne površine; detalji šarenice jasno vidljivi
2	Lako zamjetna napola providne površine; detalji šarenice lagano zatamnjeni
3	Jako zamućenje rožnice; konkretni detalji šarenice nisu vidljivi; veličina zjenice jedva je zamjetna
4	Potpuno zamućenje rožnice; šarenica nije vidljiva

42. Srednja vrijednost retencije fluoresceina za sve testirane oči izračunava se samo za 30-minutnu točku opažanja i koristi za opći nalaz kategorije za svaku ispitnu tvar (Tablica 2.).

Tablica 2.

Nalazi retencije fluoresceina

Nalaz	Opažanje
0	Nema retencije fluoresceina
0,5	Vrlo slaba obojanost pojedinačnih stanica
1	Obojanost rijetkih pojedinačnih stanica po cijeloj tretiranoj površini rožnice
2	Gusta obojanost pojedinačnih stanica, fokalno ili konfluentno
3	Retencija fluoresceina na velikim površinama rožnice, konfluentno

43. Morfološki učinci obuhvaćaju 'rupice na epitelnim stanicama rožnice, 'slabljenje epitela', 'grublju' površinu rožnice i 'lijepljenje' ispitne tvari za rožnicu. Ti nalazi mogu varirati u jačini i mogu se javiti istodobno. Kategorizacija tih nalaza subjektivna je, prema tumačenju ispitivača.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Ocjenjivanje podataka

44. Rezultate zamućenja i oticanja rožnice i retencije fluoresceina treba ocjenjivati odvojeno kako bi se dobila ICE kategorija za svaki mjereni učinak. ICE kategorije za svaki mjereni učinak zatim se kombiniraju i zajedno određuju razvrstavanje svake ispitne tvari s obzirom na njezino nadražujuće djelovanje.

Kriteriji za donošenje odluke

45. Kada je svaki mjereni učinak ocijenjen, ICE kategorije dodjeljuju se na temelju unaprijed određenog raspona. Tumačenje debljine rožnice (Tablica 3.), zamućenja (Tablica 4.) i retencije fluoresceina (Tablica 5.) primjenom četiri ICE kategorije provodi se prema sljedećim ljestvicama:

Tablica 3.

ICE kriteriji razvrstavanja za debljinu rožnice

Srednje oticanje rožnice (%) (*)	ICE Kategorija
0 do 5	I.
> 5 do 12	II.
> 12 do 18 (> 75 min nakon tretiranja)	II.
> 12 do 18 (≤ 75 min nakon tretiranja)	III.
> 18 do 26	III.

Srednje oticanje rožnice (%) (*)	ICE Kategorija
> 26 do 32 (> 75 min nakon tretiranja)	III.
> 26 do 32 (≤ 75 min nakon tretiranja)	IV.
> 32	IV.

(*) Nalazi oticanja rožnice vrijede samo ako je debljina izmjerena biomikroskopom Haag-Streit BP900 s uređajem za mjerenje dubine br. 1 i procjep svjetiljke podešen na 9½ odnosno 0,095 mm. Korisnici trebaju biti svjesni da biomikroskopi daju različite izmjere debljine rožnice kod različito podešenih širina procjeka.

Tablica 4.

ICE kriteriji razvrstavanja za zamućenje

Srednja vrijednost maksimalnih nalaza zamućenja (*)	ICE Kategorija
0,0-0,5	I.
0,6-1,5	II.
1,6-2,5	III.
2,6-4,0	IV.

(*) Vidjeti Tablicu 1.

Tablica 5.

ICE kriteriji razvrstavanja za srednju retenciju fluoresceina

Srednji nalaz retencije fluoresceina 30 minuta nakon tretiranja (*)	ICE Kategorija
0,0-0,5	I.
0,6-1,5	II.
1,6-2,5	III.
2,6-3,0	IV.

(*) Vidjeti Tablicu 2.

46. Opće razvrstavanje nadražujućih učinaka ispitne tvari *in vitro* određuje se nalazom kategorije nadraživanja koja odgovara kombinaciji kategorija dobivenih za oticanje rožnice, zamućenje rožnice i retenciju fluoresceina prema shemi prikazanoj u Tablici 6.

Tablica 6.

Opće kategorije nadražujućih učinaka *in vitro*

Razvrstavanje	Kombinacije 3 mjerena učinka
Nagrizajuća/jako nadražujuća tvar	3 × IV. 2 × IV., 1 × III. 2 × IV., 1 × II. (*) 2 × IV., 1 × I. (*) Zamućenje rožnice > 3 nakon 30 min (na najmanje 2 oka) Zamućenje rožnice = 4 u svakoj vremenskoj točki (na najmanje 2 oka) Jako slabljenje epitela (na najmanje 1 oku)

(*) Manje vjerojatne kombinacije.

47. Kao što je navedeno u stavku 1., ako ispitna tvar nije identificirana kao tvar koja nagriza ili jako nadražuje oči, za razvrstavanje i označivanje treba provesti dodatna ispitivanja. Za identifikaciju tvari s nagrizaćim i jako nadražujućim djelovanjem na oči ICE ispitna metoda ima sveukupnu točnost od 83 % (120/144) do 87 % (134/154), stopu lažno pozitivnih rezultata od 6 % (7/122) do 8 % (9/116) i stopu lažno negativnih rezultata od 41 % (13/32) do 50 % (15/30) u odnosu na podatke dobivene *in vivo* ispitnom metodom na očima zečeva razvrstane prema sustavima razvrstavanja EPA-a (1), EU-a (2) ili GHS sustavu (3). Ako se iz baze podataka izbacе tvari određenih kemijskih (tj. alkoholi i surfaktanti) i fizičkih (tj. krutine) kategorija, točnost ICE metode u sustavima razvrstavanja EU-a, EPA-a i GHS sustavu nalazi se u rasponu od 91 % (75/82) do 92 % (69/75), stopa lažno pozitivnih rezultata od 5 % (4/73) do 6 % (4/70) i stopa lažno negativnih rezultata od 29 % (2/7) do 33 % (3/9) (4).
48. Čak ako se ovim testom ispitna tvar i ne razvrsta kao nagrizaću ili jako nadražujuću za oči, podaci dobiveni ICE metodom, zajedno s podacima iz *in vivo* ispitivanja na očima zečeva ili iz odgovarajuće validiranog *in vitro* testa, mogu biti korisni za daljnje ocjenjivanje koristi i ograničenja ICE ispitne metode za identifikaciju tvari koje nisu jako nadražujuće ili uopće nisu nadražujuće (Dokument sa smjernicama za primjenu metode ispitivanja okularne toksičnosti *in vitro* je u izradi).

Kriteriji za prihvatanje studije

49. Test se smatra prihvatljivim ako se njime paralelne negativne kontrole ili kontrole nosačem/otapalom i paralelne pozitivne kontrole razvrstaju unutar kategorija nenadražujućeg odnosno jako nadražujućeg/nagrizaćeg djelovanja.

Izješće o ispitivanju

50. Izješće o ispitivanju treba sadržavati sljedeće podatke ako su relevantni za provođenje studije:

Ispitne i kontrolne tvari

Kemijski naziv(i) kao što je strukturni naziv iz popisa Chemical Abstract Service (CAS) i ostali nazivi ako su poznati;

Broj iz popisa CAS ako je poznat;

Čistoća i sastav tvari ili mješavine (u masenim postocima), do mjere u kojoj je podatak dostupan;

Fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provođenje studije, npr. agregatno stanje, hlapljivost, pH, stabilnost, kemijska kategorija, topljivost u vodi;

Obrada ispitnih/kontrolnih tvari prije ispitivanja, ako je primjenjivo (npr. zagrijavanje, mljevenje);

Stabilnost, ako je poznata.

Podaci koji se odnose na pokrovitelja i ispitni laboratorij

Naziv i adresa pokrovitelja, ispitnog laboratorija i direktora studije;

Identifikacija dobavljača očiju (tj. pogona u kojem su prikupljene);

Uvjeti skladištenja i prijevoza očiju (npr. dan i vrijeme prikupljanja očiju, vrijeme proteklo do početka ispitivanja);

Ako su dostupne, posebne karakteristike životinja od kojih su oči prikupljene (npr. dob, spol, težina životinje donora);

Opravedanost ispitne metode i primijenjeni protokol

Integritet ispitne metode

Postupak kojim se osigurava integritet (tj. točnost i pouzdanost) ispitne metode tijekom vremena (npr. periodično testiranje kemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti, primjena povijesnih podataka o negativnim i pozitivnim kontrolnim tvarima).

Kriteriji za prihvaćanje testa

Ako je primjenjivo, prihvatljiv raspon vrijednosti paralelnih kontrolnih etalona, prema povijesnim podacima.

Uvjeti ispitivanja

Opis ispitnog sustava koji se koristi;

Biomikroskop koji se koristi (npr. model);

Podaci o podešavanju instrumenata biomikroskopa koji se koristi;

Podaci o pilećim očima koje se koriste, uključujući i izjave u pogledu njihove kvalitete;

Pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku;

Koncentracija/koncentracije ispitne tvari koja se koristi;

Opis eventualnih modifikacija ispitnog postupka;

Upućivanje na povijesne podatke modela (npr. negativne i pozitivne kontrole, kemikalije za dokazivanje tehničke osposobljenosti, etaloni);

Opis kriterija koji se primjenjuju za ocjenjivanje.

Rezultati

Opis ostalih opaženih učinaka;

Ako je primjereno, fotografije oka;

*Diskusija o rezultatima**Zaključak***LITERATURA**

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni te stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006. SL L 353, 31.12.2008., str. 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. Dostupno na sljedećoj adresi:

[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. Dostupno na sljedećoj adresi:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.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. Dostupno na sljedećoj adresi:

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

- (6) Uredba (EZ) br. 1907/2006 od 18. prosinca 2006. Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i Direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ. SL L 396, 30.12.2006., str. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [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. 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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [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). Dostupno na sljedećoj adresi:
- [<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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [<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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [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. Dostupno na sljedećoj adresi:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: Tijesno slaganje rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. To je mjera uspješnosti ispitne metode i jedan od aspekata 'relevantnosti'. Često se koristi u istom značenju kao i izraz 'podudarnost' u smislu omjera točnih ishoda ispitne metode.

Etalon: Tvar koja se koristi kao standard za usporedbu s ispitnom tvari. Etalon treba imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturna i funkcionalna sličnost s kategorijom tvari koja se ispituje; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. postojanje podataka koji potvrđuju njezine poznate učinke i v. poznatu snagu u rasponu željenih reakcija.

Rožnica: Transparentni dio smješten s prednje strane očne jabučice koji prekriva šarenicu i zjenicu i propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

Zamućenje rožnice: Izmjereni stupanj zamućenja rožnice nakon izlaganja ispitnoj tvari. Povećano zamućenje rožnice je pokazatelj oštećenja rožnice.

Oteklina rožnice: Objektivno izmjeren, u ICE testu, stupanj distenzije rožnice nakon izlaganja ispitnoj tvari. Izražava se postotkom, a izračunava se iz polaznih izmjera (pred doziranje) debljine rožnice i debljine koja se bilježi u redovitim intervalima nakon izlaganja ispitnom materijalu u ICE testu. Stupanj otekline rožnice upućuje na oštećenje rožnice.

EPA Kategorija 1: Nagrizajući učinak (ireverzibilna destrukcija očnog tkiva) ili komplikacija rožnice ili nadražnost koji traju dulje od 21 dan (1).

EU Kategorija R41: Pojava oštećenja očnog tkiva ili teško fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitne tvari na prednjoj površini oka koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene (2).

Stopa lažno negativnih rezultata: Omjer svih pozitivnih tvari koje su ispitnom metodom lažno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: Omjer svih negativnih tvari koje su ispitnom metodom lažno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Retencija fluoresceina: Subjektivno mjerenje, u ICE testu, stupnja zadržavanja fluorescein natrija u epitelnim stanicama rožnice nakon izlaganja ispitnoj tvari. Stupanj retencije fluoresceina upućuje na oštećenje epitela rožnice.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija: Sustav predlaganja razvrstavanja kemikalija (tvari i mješavina) prema standardiziranim tipovima i razinama fizičkih opasnosti, opasnosti za zdravlje i opasnosti za okoliš koji obuhvaća i odgovarajuće komunikacijske elemente kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i liste sigurnosnih podataka kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima s ciljem zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i osoblje na hitnim intervencijama) i okoliša (3).

GHS Kategorija 1: Pojava oštećenja očnog tkiva ili teško fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitne tvari na prednjoj površini oka koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene (3).

Opasnost: Intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koji imaju potencijal da uzrokuju štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Negativna kontrola: Netretirana replika koja sadrži sve komponente ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima koji se tretiraju ispitnom tvari i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

Nenadražujuća tvar: Tvari koje nisu razvrstane kao tvari nadražujuće za oči EPA Kategorije I., II. ili III.; EU Kategorije R41 ili R36; ili GHS Kategorije 1., 2.A ili 2.B.

Tvar nagrizajuća za oči: (a) Tvar koja uzrokuje ireverzibilno oštećenje očnog tkiva; (b) Tvari koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči GHS Kategorije 1., EPA Kategorije I. ili EU Kategorije R41 (1) (2) (3).

Tvar nadražujuća za oči: (a) Tvar koja nakon primjene na prednju površinu oka dovodi do reverzibilne promjene u oku; (b) Tvari koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči EPA Kategorije II. ili III., EU Kategorije R36 ili GHS Kategorije 2.A ili 2.B (1) (2) (3).

Tvar jako nadražujuća za oči: (a) Tvar koja nakon primjene na prednju površinu oka uzrokuje oštećenje očnog tkiva koje nije reverzibilno unutar 21 dan od primjene ili uzrokuje ozbiljno fizičko pogoršanje vida. (b) Tvari koje su razvrstane kao tvari nadražujuće za oči GHS Kategorije 1., EPA Kategorije I. ili EU Kategorije R41 (1) (2) (3).

Pozitivna kontrola: Replika koja sadrži sve komponente ispitnog sustava i tretirana je s tvari za koju se zna da izaziva pozitivnu reakciju. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti reakcije pozitivne kontrole tijekom vremena, jačina reakcije ne bi trebala biti prekomjerna.

Pouzdanost: Stupanj mjerne obnovljivosti provedene ispitne metode koji se može postići u jednom ili između više laboratorija, tijekom vremena i uz primjenu istog protokola. Procjenjuje se izračunom intra i inter-laboratorijske mjerne obnovljivosti i intra-laboratorijske ponovljivosti.

Biomikroskop: Instrument koji se koristi za izravan pregled oka pod povećalom binokularnog mikroskopa koji stvara uspravnu stereoskopsku sliku. Kod ICE ispitne metode taj se instrument koristi za gledanje prednjih struktura pilećeg oka kao i za objektivno mjerenje debljine rožnice pomoću prigrađenog uređaja za mjerenje dubine.

Kontrola otapalom/nosačem: Netretirani uzorak koji sadrži sve komponente ispitnog sustava, uključujući i otapalo ili nosač, koji se obrađuje s uzorcima tretiranim ispitnom tvari i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdila polazna reakcija za uzorke koji se tretiraju ispitnom tvari otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se testira s paralelnom negativnom kontrolom, ovaj uzorak također dokazuje jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Stupnjevano testiranje: Strategija testiranja korak po korak u kojoj se svi postojeći podaci o ispitnoj tvari pregledavaju po točno utvrđenom redu s tim da se prije prelaska na sljedeću razinu, na svakoj razini primjenjuje postupak ocjenjivanja dokazne snage kako bi se odredilo ima li dovoljno podataka da se donese odluka o razvrstavanju tvari kao opasne. Ako se na temelju postojećih podataka ispitnoj tvari može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje testiranje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih podataka ispitnoj tvari ne može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, korak po korak provodi se sekvencijski postupak testiranja na životinjama dok razvrstavanje ne bude nedvosmisleno utvrđeno.

Validirana ispitna metoda: Ispitna metoda za koju su provedene validacijske studije kojima je utvrđena relevantnost (uključujući i točnost) i pouzdanost za specifičnu svrhu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda ne mora biti dostatno uspješna u smislu točnosti i pouzdanosti da bi se smatrala prihvatljivom za predloženu svrhu.

Ocjenjivanje dokazne snage: Postupak razmatranja snage i slabosti raznih podataka u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti neke tvari.

Dodatak 2.

KEMIČALIJE ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI ZA ICE ISPITNU METODU

Prije rutinske primjene ispitne metode koja odgovara ovoj ispitnoj metodi, laboratoriji možda žele dokazati tehničku osposobljenost tako da za 10 tvari preporučenih u Tablici 1. točno identificiraju kategoriju nagrizajućeg djelovanja na oči. Te su tvari tako izabrane da predstavljaju niz reakcija na lokalno nadraživanje/nagrizanje očiju koje se temelje na rezultatima *in vivo* testa na očima zečeva (TG 405) (tj. Kategorije 1., 2.A, 2.B ili 'Nije razvrstano ni označeno' prema sustavu GHS UN-a (3) (7)). Međutim, uzimajući u obzir da je korisnost tih pokusa validirana (samo za identifikaciju tvari s nagrizajućim/jako nadražujućim djelovanjem na oči), za dokazivanje tehničke osposobljenosti postoje samo dva ishoda testa u svrhe razvrstavanja tvari (nagrizajuća/jako nadražujuća ili nije nagrizajuća/nije jako nadražujuća). Drugi kriteriji za odabir bili su da tvari budu komercijalno dostupne, da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i da postoje visokokvalitetni podaci iz dvije *in vitro* metode za koje su izrađene Smjernice za testiranje (Test Guidelines). Iz tog razloga nadražujuće tvari odabrane su s popisa od 122 referentne tvari koje ICCVAM preporučuje za validaciju *in vitro* ispitnih metoda toksičnosti za oči (vidjeti Dodatak H, Popis referentnih tvari prema preporuci ICCVAM-a) (4). Referentni podaci dostupni su u dokumentima ICCVAM-a (*Background Review Documents*) za ispitne metode BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability – Zamućenje i propusnost goveđe rožnice) i ICE (18) (19).

Tablica 1.

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za metodu ICE

Tvar	CAS br.	Kemijska kategorija ⁽¹⁾	Agregatno stanje	<i>In Vivo</i> razvrstavanje ⁽²⁾	<i>In Vitro</i> razvrstavanje ⁽³⁾
Benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Klorheksidin	55-56-1	Amin, Amidin	Krutina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Dibenzoil-L-vinska kiselina	2743-38-6	Karboksilna kiselina, ester	Krutina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Imidazol	288-32-4	Heterociklični	Krutina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
Triklorooctena kiselina (30 %)	76-03-9	Karboksilna kiselina	Tekućina	Kategorija 1.	Nagrizajuća/Jako nadražujuća tvar
2,6-diklorobenz-oil klorid	4659-45-4	Acil halid	Tekućina	Kategorija 2.A	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
Etil-2-metilaceto-acetat	609-14-3	Keton, ester	Tekućina	Kategorija 2.B	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
Amonijev nitrat	6484-52-2	Anorganska sol	Krutina	Kategorija 2.A	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Tekućina	Nije označeno	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar
n-Heksan	110-54-3	Ugljikovodik (aciklički)	Tekućina	Nije označeno	Nije nagrizajuća/Nije jako nadražujuća tvar

Kratice: CAS br. = Broj iz popisa kemikalija Chemical Abstracts Service Registry

⁽¹⁾ Kemijska kategorija određena je za svaku ispitnu tvar primjenom standardnog sustava razvrstavanja koji se zasniva na sustavu razvrstavanja Medical Subject Headings (MeSH) Nacionalne medicinske biblioteke SAD-a (dostupno na adresi <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Na temelju rezultata *in vivo* testa na očima zečeva (Smjernica OECD-a za ispitivanje TG 405) i primjenom GHS UN-a (3)(7).

⁽³⁾ Na temelju rezultata ispitnih metoda BCOP i ICE.

Dodatak 3.

Shematski prikaz uređaja za superfuziju i stezaljke za oko

(Za dodatne generičke opise uređaja za superfuziju i stezaljke za oko, vidjeti Burton et al. (17))

