

## A BIZOTTSÁG 1152/2010/EU RENDELETE

(2010. december 8.)

**a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról**

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről szóló, 2006. december 18-i 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre <sup>(1)</sup> és különösen annak 13. cikke (3) bekezdésére,

mivel:

- (1) A 440/2008/EK bizottsági rendelet <sup>(2)</sup> meghatározza az 1907/2006/EK rendelet céljára az anyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározására alkalmazandó vizsgálati módszereket.
- (2) Annak érdekében, hogy a kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó tagállami törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelí-

téséről szóló, 1986. november 24-i 86/609/EGK tanácsi irányelvnek <sup>(3)</sup> megfelelően a kísérleti célokra felhasznált állatok számát csökkenteni lehessen, elsőbbségi intézkedés keretében indokolt a 440/2008/EK rendeletet két új, az OECD által a közelmúltban elfogadott in vitro szemirritációs vizsgálati módszerrel kiegészíteni. E rendelet tervezetéről egyeztetés történt az érdekeltekkel.

- (3) A 440/2008/EK rendeletet ennek megfelelően módosítani kell.
- (4) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az 1907/2006/EK rendelet 133. cikkével létrehozott bizottság véleményével,

ELGOGADTA EZT A RENDELETET:

## 1. cikk

A 440/2008/EK rendelet mellékletének B. része kiegészül az e rendelet melléklete szerinti B.47. és B.48. fejezettel.

## 2. cikk

Ez a rendelet Az Európai Unió Hivatalos Lapjában történő kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2010. december 8-án.

a Bizottság részéről  
az elnök

José Manuel BARROSO

<sup>(1)</sup> HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

<sup>(2)</sup> HL L 142., 2008.5.31., 1. o.

<sup>(3)</sup> HL L 358., 1986.12.18., 1. o.

## MELLÉKLET

**„B.47. SZARVASMARHA-SZARUHÁRTYA OPACITÁSÁNAK ÉS PERMEABILITÁSÁNAK MÉRÉSÉN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA**

## BEVEZETÉS

1. A szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer (a továbbiakban: BCOP vizsgálat) olyan *in vitro* vizsgálati módszer, amely bizonyos körülmények között és bizonyos korlátok mellett felhasználható anyagok és vegyületek »szemkorróziót és súlyos szemirritációt okozóként« történő besorolására (1) (2) (3). E vizsgálati módszer alkalmazásában súlyos szemirritációt okozó anyagok azok az anyagok, amelyek a nyulak esetében a felvitelt követően legalább 21 napon át tartó szemléziókat okoznak. Noha a vizsgálat nem váltja ki teljes mértékben a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot, a BCOP vizsgálat alkalmazása a szabályozói követelmények szerinti besorolás és címkézés egy adott alkalmazási területen történő meghatározására szolgáló, többszintű vizsgálati stratégia részeként ajánlott (4) (5). A vizsgált anyagok és keverékek (6) nyulakon végzett további vizsgálatok nélkül »szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó« besorolást kaphatnak. Azokat az anyagokat, amelyek vizsgálata negatív eredményt adott, az OECD 405. vizsgálati iránymutatásában (e melléklet B.5. fejezete) (7) leírtak szerint lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával nyulakon végzett további vizsgálatoknak kell alávetni.
2. E vizsgálati módszer célja a vizsgált anyag szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó esetleges hatásának kimutatása annak alapján, hogy izolált szarvasmarha-szaruhártyában milyen mértékben vált ki opacitást és fokozott permeabilitást. A szaruhártyára gyakorolt toxikus hatások jellemzése (i) a csökkent fényátbocsátás (opacitás) és (ii) a fluorescein-nátrium festékanyag fokozott áthatolása (permeabilitás) mérésével történik. A szaruhártya vizsgált anyagnak való expozícióját követően megállapítható opacitásból és permeabilitásból együttesen származtatjuk az ún. *in vitro* irritációs pontszámot (In Vitro Irritancy Score, a továbbiakban: IVIS), amely a vizsgált anyag irritáció szempontjából való osztályba sorolására szolgál.
3. A BCOP vizsgálattal 21 napnál rövidebb idő alatt gyógyuló szemléziókat kiváltó szemirritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagokat is vizsgáltak. Az ezekbe a kategóriákba tartozó anyagok tekintetében azonban nem történt meg a BCOP vizsgálat pontosságának és megbízhatóságának formális értékelése.
4. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

## KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. E vizsgálati módszer alapja az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) BCOP vizsgálati protokollja (8), amelynek kidolgozása az alternatív módszerek validálásával foglalkozó európai, illetve japán központ (ECVAM, JaCVAM) részvételével végrehajtott nemzetközi validációs vizsgálat (4) (5) (9) alapján történt. A protokoll alapját az In Vitro Tudományok Intézetétől (IIVS) kapott adatok, illetve az INVITTOX 124. protokoll (10) képezi; ez a protokoll szolgált a BCOP vizsgálat Európai Közösség által finanszírozott, 1997–1998-ban elvégzett elővalidációjának protokolljaként. Mindkét protokoll alapja az a BCOP vizsgálati módszer, amelyről elsőként Gautheron et al. (11) számolt be.
6. A vizsgálati módszer azonosított korlátai a validációs adatbázisban az alkoholok és a ketonok esetében tapasztalt nagy hamis pozitív arányokon és a szilárd anyagok esetében tapasztalt nagy hamis negatív arányon alapulnak (lásd a 44. pontot) (5). Ha az említett kémiai és fizikai osztályokba tartozó anyagokat kizárjuk az adatbázisból, akkor a BCOP vizsgálat pontossága az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerében egyaránt jelentősen javul (5). A vizsgálat célját (azaz kizárólag a szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) is figyelembe véve a hamis negatív arányok jelentősége nem kritikus, hiszen az érintett anyagokat a szabályozói követelményektől függően – az adatok bizonyító erejének mérlegelésével, lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával – később nyulakon vagy más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálatokkal is megvizsgálják. Emellett a jelenleg rendelkezésre álló validációs adatbázis nem teszi lehetővé egyes kémiai osztályok vagy termékcsoportok (például a keverékek) megfelelő értékelését. A vizsgálat végrehajtója azonban a vizsgálati módszer alkalmazását valamennyi típusú vizsgálandó anyag esetében (beleértve a keverékeket is) fontolóra veheti, a pozitív eredmény ugyanis ilyenkor is elfogadható lehet a szemkorrózió, illetve a súlyosan irritatív hatás jelzésére. Az alkoholok és a ketonok esetében azonban a kapott pozitív eredményeket a túlzó előrejelzés kockázata miatt óvatossággal kell értelmezni.
7. A szarvasmarhaszemmel és a szarvasmarha-szaruhártyával végzett valamennyi eljárás során be kell tartani a vizsgálati intézménynek az állati eredetű anyagok – ideértve többek között a szöveteket és a szöveti folyadékokat – kezelésére vonatkozó rendelkezéseit és eljárásait. Ajánlott továbbá követni az általános laboratóriumi óvintézkedéseket is (12).
8. A vizsgálati módszernek korlátja, hogy noha figyelembe vesz egyes szemre gyakorolt, a nyulakon végzett szemirritációs vizsgálatban elemzett hatásokat, illetve bizonyos fokig azok súlyosságát is, nem veszi figyelembe a kötőhártya- és az íriszsérüléseket. Másrészt, noha maga a BCOP vizsgálat nem alkalmas a szaruhártya-léziók visszafordíthatóságának értékelésére, a nyulakon végzett szemvizsgálatok alapján korábban javasolták, hogy a szaruhártya-sérülés kezdeti mélységének értékelése alkalmas lehet a visszafordíthatatlan és a visszafordítható hatások megkülönböztetésére (13). Végeterül a BCOP vizsgálat nem alkalmas a szembe kerülés következtében fellépő szisztémás toxicitási potenciál megítélésére.

9. Továbbra is folyik a munka a BCOP vizsgálat nem súlyos irritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagok azonosítására való használhatósága, valamint korlátai részletesebb leírása érdekében (lásd még a 45. pontot is). A felhasználókat bátorítjuk arra, hogy mintáikat és/vagy adataikat küldjék meg a validáló szervezeteknek, ezzel ugyanis segíthetik a BCOP vizsgálat jövőbeli felhasználásainak (ideértve a nem súlyos irritációt okozó, illetve az irritációt nem okozó anyagok azonosítását is) formális értékelését.
10. Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, a 2. függelékben felsorolt jártassági teszt-anyagok felhasználásával ajánlatos meggyőződni felkészültségéről. Mielőtt a laboratórium a BCOP vizsgálat adatait a szabályozói követelmények szerinti veszélyességi besorolás céljaira rendelkezésre bocsátaná, a vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja a BCOP vizsgálat elvégzésében való jártasságát.

#### A VIZSGÁLAT ELVE

11. A BCOP vizsgálat olyan organotipikus módszer, amely rövid távon *in vitro* fenntartja a szarvasmarhák izolált szaruhártyájának normál fiziológiai és biokémiai működését. A módszerrel a vizsgált anyag által okozott károsodás jellemzése a szaruhártya opacitásváltozásának opaciméterrel, illetőleg permeabilitásváltozásának látható fényes fény-spektroszkópiával való kvantitatív mérése útján történik. A két mérés alapján számítjuk az IVIS értékét, amely a vizsgált anyag *in vivo* szemirritációs hatásának előrejelzését megalapozó *in vitro* veszélyességi besorolási kategória megállapítására szolgál (lásd a döntési kritériumokat).
12. A BCOP vizsgálat frissen levágott szarvasmarhából izolált szaruhártyákat használ fel. A szaruhártya opacitásának mérése kvantitatív módon, a szaruhártyán átbocsátott fény mennyiségének mérésével történik. A permeabilitás mérése ugyancsak kvantitatív módon, a szaruhártya teljes vastagságán áthatoló és a hátsó kamrában található közegben kimutatható fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérésével történik. A vizsgált anyagoknak a szaruhártya felhámjának felületére történő felvitele a szaruhártyatartó elülső kamrájába történő bevitellel történik. A 3. függelék tartalmazza a BCOP vizsgálatban felhasznált szaruhártyatartó leírását és ábráját. A szaruhártyatartó a kereskedelmi forgalomban különféle forrásokból beszerezhető, vagy saját használatra megépíthető.

#### A szarvasmarhaszemek származása és életkora, az állatfaj kiválasztása

13. A vágóhídon a szarvasmarhákat rendszerint emberi fogyasztás céljából vagy más kereskedelmi célokból ölik le. A BCOP vizsgálat céljára felhasználandó szaruhártyák csak az emberi élelmiszerláncba való bekerülésre alkalmas, egészséges állatokból vehetők. Mivel a szarvasmarhák tömege fajtától, életkortól és nemtől függően jelentős mértékben eltérhet, a vágásra kerülő állatok tekintetében nincs ajánlott tömeg.
14. Különböző életkorú állatokból származó szemek esetén a szaruhártya mérete változó lehet. A 30,5 mm vízszintes átmérőt meghaladó és legalább 1 100 µm középponti vastagságú szaruhártyák általában nyolcévesnél idősebb, a 28,5 mm átmérő és 900 µm középponti vastagság alatti szaruhártyák általában ötévesnél fiatalabb szarvasmarhából származnak (14). Emiatt nem szokás 60 hónaposnál idősebb szarvasmarhából származó szaruhártyákat felhasználni. Hagyományosan nem szokás 12 hónaposnál fiatalabb szarvasmarhából származó szemeket sem felhasználni, mivel ebben az életkorban a szemek még fejlődésben vannak, és a szaruhártya vastagsága és átmérője lényegesen kisebb a kifejlett szarvasmarhából származó szaruhártyákon mért értékeknél. Előnyeikre való tekintettel ugyanakkor megengedhető a fiatal (6 és 12 hónap közötti életkorú) állatokból származó szaruhártyák használata is, mivel ezek nagyobb mennyiségben állnak rendelkezésre, szűkebb az életkori tartományuk, és ez esetben kisebb a munkavállalóknak a szarvasmarhák szivacsos agyvelőbántalmával szembeni kitétsége is (15). Mivel a szaruhártya méretének és vastagságának a korróziót és az irritációt okozó anyagokkal szembeni reakciókára gyakorolt hatásával kapcsolatban hasznos volna további értékelést végezni, a felhasználókat bátorítjuk arra, hogy számoljanak be a vizsgálataikban felhasznált szaruhártyákat adó állatok becsült életkoráról és/vagy tömegéről.

#### A szemek begyűjtése és beszállítása a laboratóriumba

15. A szemeket a vágóhíd alkalmazottai gyűjtik be. A mechanikai és egyéb károsodásnak a lehető legkisebb mértékűre való csökkentése érdekében a szemeket a halál bekövetkezése után mihamarabb ki kell venni. A szemek potenciálisan irritatív anyagokkal szembeni expozíciójának megelőzése érdekében a vágóhíd alkalmazottai az állat fejének leöblítésekor mosószert nem használhatnak.
16. A szemeket megfelelő méretű edénybe öntött Hank-féle sóoldatba (HBBS-oldat) kell helyezni oly módon, hogy az oldat a szemeket teljesen befedje, és a laboratóriumba oly módon kell beszállítani, hogy a lehető legkisebb legyen a károsodás és/vagy a bakteriális fertőzés esélye. Mivel a begyűjtés a vágás során történik, a szemek vérral és más biológiai anyagokkal – ideértve a baktériumokat és más mikroorganizmusokat is – érintkezhetnek. Ezért fontos annak biztosítása, hogy a kontamináció veszélye a lehető legkisebb legyen (például a szemeket tartalmazó edény jégen tárolásával, a szemek szállítás közbeni tárolására használt HBBS-oldathoz antibiotikumok [például penicillin 100 IU/ml és streptomycin 100 mg/ml koncentrációban] hozzáadásával).
17. A szemek begyűjtése és a szaruhártyának a BCOP vizsgálatban való felhasználása között eltelt időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie (a begyűjtésnek és a felhasználásnak rendszerint ugyanazon a napon meg kell történnie), és igazolni kell, hogy ez az idő nem befolyásolja a vizsgálat eredményeit, azaz a szemek kiválasztási kritériumait, valamint a pozitív és a negatív kontrollminták eredményeit. A vizsgálatban felhasznált valamennyi szemnek egy meghatározott napon begyűjtött szemállományból kell származnia.

**A BCOP vizsgálatban felhasznált szemek kiválasztási kritériumai**

18. A szemek épségét a laboratóriumba való beérkezést követően gondosan meg kell vizsgálni; ennek keretében ellenőrizni kell különösen a fokozott opacitást, valamint a karcolások és a rendellenes érburjánzás (neovaszkularizáció) jelenlétét. A vizsgálat céljára csak ép szemekből származó szaruhártyák használhatók fel.
19. Az egyes szaruhártyák minőségét a vizsgálat során később is kell értékelni. A vizsgálatból ki kell zárni azokat a szaruhártyákat, amelyek opacitása a kezdeti egyórás ekvilibrációs időszak elteltével hét opacitásegységnél nagyobb (MEGJEGYZÉS: az opacimérték az opacitási egységek meghatározásához használt opacitásetalonnal kell kalibrálni, lásd a 3. függelék).
20. Minden kezelt csoportnak (a vizsgált anyaggal és a negatív és a pozitív kontrollanyaggal kezelt csoportnak egyaránt) legalább három szemből kell állnia. A BCOP vizsgálatban a negatív kontroll céljára három szaruhártyát kell felhasználni. Mivel a szaruhártyák a teljes szemgolyóból kivágással kerülnek eltávolításra, majd pedig rögzítésre kerülnek a szaruhártyakamrában, fennáll annak a veszélye, hogy a különböző műveletek befolyásolják az egyes szaruhártyák (a negatív kontrollt is ideértve) opacitás- és permeabilitásértékét. Figyelembe veendő még az is, hogy az IVIS számítása során a vizsgált anyaggal és a pozitív kontrollanyaggal kezelt szaruhártyák opacitás- és permeabilitásértékeinek korrekciója a negatív kontrollanyaggal kezelt szaruhártyák opacitás- és permeabilitásértékeinek felhasználásával történik.

**ELJÁRÁS****A szemek előkészítése**

21. Az ép szaruhártyákat a későbbi kezelés elősegítése érdekében preparáljuk úgy, hogy a szaruhártya körül 2–3 mm-es perem maradjon, ügyelve arra, hogy a szaruhártya fel- és belhámja ne sérüljön. A preparált szaruhártyákat felerősítjük az erre a célra kialakított, a szaruhártya felhámja elé kerülő elülső, illetve belhámja elé kerülő hátsó kamrából álló szaruhártyatartókra. Mindkét kamrát (a hátsó kamrával kezdve) teljesen feltöltjük előmelegített Eagle-féle tápfolyadékkal (Eagle's Minimum Essential Medium, a továbbiakban: EMEM oldat), ügyelve a buborékképződés megelőzésére. A berendezést ezt követően  $32 \pm 1$  °C-on legalább egy órán át ekvilibráljuk annak érdekében, hogy a szaruhártyák a közegeg kiegyenlítődjenek, és lehetőség szerint elérjék normális metabolikus aktivitásukat (a szaruhártya felületének hőmérséklete *in vivo* 32 °C).
22. Az ekvilibrációs idő eltelte után mindkét kamrát új EMEM oldattal feltöltjük, és minden egyes szaruhártyán leolvassuk a kiindulási opacitásértéket. A vizsgálatból ki kell zárni a makroszkopikus szöveti károsodást (például karcolásokat, elszíneződést, rendellenes érburjánzást) mutató és a 7-nél nagyobb opacitású szaruhártyákat. Kiszámítjuk valamennyi ekvilibrált szaruhártya opacitásának számtani közepét. A negatív kontroll céljára legalább három olyan szaruhártyát kell kiválasztani, amelynek opacitása az összes szaruhártyán mért opacitásértékek mediánjának közelében van. A megmaradó szaruhártyákat ezt követően kezelt csoportra és pozitív kontrollcsoportra osztjuk.
23. Mivel a víz fajhője nagyobb, mint a levegőé, a víz stabilabb hőmérsékleti viszonyokat biztosít az inkubáláshoz. Ezért a szaruhártyatartó és tartalmának  $32 \pm 1$  °C hőmérsékleten való tartására vízfürdő használata ajánlott. A hőmérséklet állandóságának biztosítását szolgáló óvintézkedések (például a tartók és a közeg előmelegítése) mellett azonban használható levegős inkubátor is.

**A vizsgált anyag felvitele**

24. Két eltérő kezelési protokoll használatos, az egyik a folyadékok és a szilárd és a folyékony felületaktív anyagok, a másik pedig a nem felületaktív szilárd anyagok esetében.
25. A folyadékok vizsgálata hígítatlan állapotban, a felületaktív anyagoké 10 vegyes százalék (m/V) koncentrációban, 0,9 %-os nátrium-klorid oldattal, desztillált vízzel vagy más olyan oldószerezellel készített oldatban történik, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra. A félszilárd anyagok, krémek és gyanták vizsgálata rendszerint a folyadékokra vonatkozó protokoll szerint történik. Ha a hígítás koncentrációja ettől eltérő, akkor azt megfelelően meg kell indokolni. A szaruhártyákat a folyadéknak vagy felületaktív anyagnak 10 percig kell kitenni. Ettől eltérő behatási idő alkalmazását tudományos szempontból megfelelően meg kell indokolni.
26. A nem felületaktív szilárd anyagok vizsgálata 20 % koncentrációban, 0,9 %-os nátrium-klorid-oldattal, desztillált vízzel vagy más olyan oldószerezellel készített oldat vagy szuszpenzió formájában történik, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra. A szilárd anyagok bizonyos körülmények között és megfelelő tudományos indokollással hígítatlanul, a szaruhártya felületére a nyitott kamrás módszerrel (lásd a 29. pontot) való közvetlen felvitellel is vizsgálhatók. A szaruhártyát a szilárd anyagnak négy órán át kell kitenni, de a folyadékok és a felületaktív anyagok esetéhez hasonlóan – tudományos szempontú megfelelő indokollással – más behatási idő is alkalmazható.
27. A vizsgált anyag fizikai jellegétől és kémiai jellemzőitől (pl. szilárd anyag vagy folyadék, viszkozus vagy nem viszkozus folyadék) függően más felviteli módok is alkalmazhatók. A legfontosabb annak biztosítása, hogy a vizsgált anyag megfelelően beborítsa a felhám felületét, valamint hogy azt az öblítési lépések során megfelelően eltávolítsuk. A nem és a kissé viszkozus folyadékok esetében rendszerint a zárt kamrás, míg a közepes és a nagy viszkozitású folyadékok, illetve a szilárd anyagok esetében rendszerint a nyitott kamrás módszer használatos.

28. A zárt kamrás módszer esetében az előlő kamrába a szaruhártya felhámjának befedéséhez elegendő mennyiségű (750 µl) vizsgált anyagot kell a kamra tetején található adagolónyílásokon keresztül bevinni, majd az expozíció idejére a nyílásokat a kamradugaszokkal le kell zárni. Fontos annak biztosítása, hogy valamennyi szaruhártya megfelelő ideig legyen kitéve a vizsgált anyagnak.
29. A nyitott kamrás módszer esetében a kezelés előtt levesszük az előlő kamra ablakzáró gyűrűjét és az ablaknyílás üvegét. A kontrollanyagot vagy a vizsgált anyagot (750 µl vagy a szaruhártya teljes befedéséhez szükséges mennyiségben) mikropipettával közvetlenül a szaruhártya felhámjának felületére visszük fel. Ha a vizsgált anyagot nehezen lehet pipettába felszívni, akkor az adagolás megkönnyítésére finnpipettába pumpálható. A finnpipetta hegyét behelyezzük a fecskendő adagolójába, hogy az anyagot nyomás alatt lehessen befecskendezni a hegybe. A fecskendő dugattyúját a pipetta szelepének felfelé húzásával egyidejűleg benyomjuk. Ha a pipetta hegyében légbuborékok jelennek meg, a vizsgálati anyagot el kell távolítani (ki kell nyomni) és a műveletet mindaddig ismételni kell, amíg a pipetta hegye légbuborékok nélkül feltelik. Szükség esetén normál fecskendő is használható (tű nélkül), mivel ez lehetővé teszi a vizsgált anyag pontos mérését és a szaruhártya felhámjának felületére való egyszerű felvitelét. Az adagolást követően a zárt rendszer visszaállítása érdekében az ablaknyílás üvegét vissza kell szerelni az előlő kamrára.

#### **Inkubáció a behatást követően**

30. A behatási idő elteltével a vizsgált anyagot vagy negatív vagy pozitív kontrollanyagot kivesszük az előlő kamrából, és a felhámot legalább háromszor (de legalább a vizsgált anyag látható nyomainak teljes eltávolításáig) fenolvörös indikátort tartalmazó EMEM oldattal lemosuk. Az öblítéshez azért kell fenolvörös indikátort tartalmazó közeget használni, mert a fenolvörös indikátor színváltozásának megfigyelésével ellenőrizhető a savas és a lúgos anyagok leöblítésének eredményessége. A szaruhártyát háromnál többször is le kell mosni, ha a fenolvörös indikátor még mindig elszíneződik (sárgára vagy lilára) vagy ha a vizsgált anyag még mindig látható. A közeg vizsgált anyagtól való megtisztítását követően a szaruhártyákat még egyszer le kell mosni EMEM oldattal (mely ekkor fenolvörös indikátort már nem tartalmaz). Az utolsó öblítéshez azért kell fenolvörös indikátort nem tartalmazó EMEM oldatot használni, mert így biztosítható az opacitásmérés előtt a fenolvörös indikátornak az előlő kamrából való eltávolítása. Ezt követően az előlő kamrát – fenolvörös indikátor bekeverése nélkül – ismételt feltöltjük új EMEM oldattal.
31. Folyadékok és felületaktív anyagok esetében a szaruhártyákat az öblítést követően legalább további két órán át  $32 \pm 1$  °C hőmérsékleten inkubálni kell. Bizonyos körülmények között hasznos lehet hosszabb utóinkubációs időt alkalmazni, amiről eseti alapon kell dönten. A szilárd anyagokkal kezelt szaruhártyákat a négyórás behatási idő végén alaposan le kell öblíteni, utóinkubáció azonban nem szükséges.
32. Folyadékok és felületaktív anyagok esetében az utóinkubáció végén, nem felületaktív szilárd anyagok esetében a négyórás behatási idő elteltével minden egyes szaruhártya opacitását és permeabilitását feljegyezzük. Egyben minden szaruhártyát szemrevételezéssel is megvizsgálunk, és az esetleges észrevételeket (pl. szövetleválás, vizsgált anyag maradáka, egyenetlen fényáteresztési minták) feljegyezzük. Ezek a megfigyelések fontosak lehetnek, mert befolyásolhatják az opaciméteren leolvasott értékeket.

#### **Kontrollanyagok**

33. Minden vizsgálatban párhuzamosan negatív vagy oldószeres/vivőanyagos kontrollt és pozitív kontrollt is kell végezni.
34. Hígitatlan folyadékok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése és a vizsgálat végpontjaiban figyelembe veendő kiindulási értékek meghatározása céljából a BCOP vizsgálatban párhuzamos negatív kontrollanyagot (például 0,9 %-os nátrium-klorid oldatot vagy desztillált vizet) kell alkalmazni. A negatív kontrollanyag alkalmazása egyben azt is biztosítja, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást.
35. Hígított folyadékok, felületaktív anyagok és szilárd anyagok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése és a vizsgálat végpontjaiban figyelembe veendő kiindulási értékek meghatározása céljából a BCOP vizsgálatban párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollt kell alkalmazni. Csak olyan oldószer, illetve vivőanyag alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra.
36. Annak ellenőrzése érdekében, hogy a kiváltott hatás valóban megfelelő-e, a vizsgálatnak mindig tartalmaznia kell egy ismert szemirritációt okozó anyaggal végzett párhuzamos pozitív kontrollvizsgálatot is. Mivel a BCOP vizsgálat célja a szemkorroziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása, a pozitív kontrollanyagként ideális esetben olyan referenciaanyagnak kell lennie, amely ebben a vizsgálatban súlyos hatást vált ki. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, az irritatív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.
37. Folyékony vizsgált anyagok esetében pozitív kontrollanyagként például dimetil-formamid vagy 1 %-os nátrium-hidroxid alkalmazható. Szilárd vizsgált anyagok esetében pozitív kontrollanyagként például 0,9 %-os nátrium-klorid-oldathoz 20 vegyes százalék (m/V) koncentrációban adagolt imidazol alkalmazható.



38. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyianyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

#### Mért végpontok

39. Az opacitást a szaruhártyán átbocsátott fény mennyiségének mérésével határozzuk meg. A szaruhártya opacitásának kvantitatív mérése opaciméterrel történik, amely a mért opacitásértéket folyamatos skálán mutatja.
40. A permeabilitás meghatározása a szaruhártya összes sejtrétegén (azaz a szaruhártya külső felületén a felhámától a szaruhártya belső felületén a belhámig) áthatoló fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérésével történik. A szaruhártyatartónak a felhám elé kerülő elülső kamráját 1 ml (folyadék vagy felületaktív anyag vizsgálata esetében 4 mg/ml, nem felületaktív szilárd anyag vizsgálata esetében 5 mg/ml) fluoreszcein-nátrium-oldattal, a belhám elé kerülő hátsó kamrárt pedig új EMEM oldattal feltöltjük. A tartót ezt követően vízszintes helyzetben  $90 \pm 5$  percig  $32 \pm 1$  °C hőmérsékleten inkubáljuk. A hátsó kamrába áthatoló fluoreszcein-nátrium mennyiségének mérése ultrabolya- és látható fényes fényspektroszkópiás eljárással történik. Az eljárás keretében folyamatos skálán meg kell határozni és fel kell jegyezni a 490 nm-hez tartozó optikai sűrűségek ( $OD_{490}$ ) vagy abszorbanciák értékét. A fluoreszceines mérés keretében a permeabilitásértékeket a szabványos 1 cm-es fényút alkalmazásával, a látható fényes fényspektroszkópiával mért  $OD_{490}$  értékek alapján kell meghatározni.
41. Az előzőekben leírt módszer alternatívájaként 96 lyukú mikrotiterlemez-olvasó is alkalmazható azzal a feltétellel, hogy (i) a fluoreszceines  $OD_{490}$  értékek meghatározásához megállapítható a lemezolvasó lineáris tartománya, és (ii) a 96 lyukú lemezbe annyi fluoreszceinmintát teszünk, amennyi ahhoz szükséges, hogy az így meghatározott  $OD_{490}$  értékek megegyezzenek a szabványos 1 cm-es fényúttal mért értékekkel (ehhez gyakran teljesen [általában 360 ml-rel] feltöltött lyukak szükségesek).

#### ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

##### Az adatok kiértékelése

42. Azt követően, hogy az opacitás- és az átlagos permeabilitásértékeket ( $OD_{490}$ ) a háttéropacitás, illetve a negatív kontroll  $OD_{490}$  permeabilitásértékeinek figyelembevételével korrigáltuk, az egyes kezelt csoportok átlagos opacitás- és átlagos  $OD_{490}$  permeabilitásértékeit egy kísérleti úton származtatott összefüggés segítségével kezelt csoportonként egyetlen jelzőszámmá, az *in vitro* irritációs pontszámmá (IVIS) alakítjuk:

$$IVIS = \text{átlagopacitás} + (15 \times OD_{490} \text{ átlagpermeabilitás}).$$

Sina et al. (16) szerint ezt az összefüggést belső és laboratóriumi közti vizsgálatok keretében dolgozták ki. Egy több laboratóriumban 36 anyagon elvégzett vizsgálatsorozat adatain többváltozós analízist hajtottak végre azon összefüggés meghatározása végett, amely az *in vivo* és az *in vitro* adatok között a legjobb illeszkedést biztosítja. Ezt az analízist két különböző cég kutatói is elvégezték, és csaknem azonos összefüggésre jutottak.

43. Az opacitás- és a permeabilitásértékeket egymástól függetlenül is ki kell értékelni annak meghatározására, hogy a vizsgált anyag a korróziót vagy a súlyos irritációt nem csak a két végpont egyikében váltotta-e ki (lásd a döntési kritériumokat).

#### Döntési kritériumok

44. Korróziót vagy súlyos irritációt okozónak kell tekinteni azt az anyagot, amelyre  $IVIS \geq 55,1$  adódik. Mint az 1. pontban láttuk, ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozónak, akkor a besorolás és a címkézés céljára további vizsgálatokat kell végezni. A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból származó, az EPA (1), az EU (2) vagy a GHS (3) besorolási rendszer szerint osztályozott adatokkal összehasonlítva a BCOP vizsgálat általános pontossága 79 % (113/143) és 81 % (119/147) között, hamis pozitív aránya 19 % (20/103) és 21 % (22/103) között, hamis negatív aránya pedig 16 % (7/43) és 25 % (10/40) között van. Ha az adatbázisból egyes meghatározott kémiai (alkoholok, ketonok) vagy fizikai (szilárd anyagok) osztályokat kizárunk, akkor az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerben a BCOP vizsgálat pontossága 87 % (72/83) és 92 % (78/85), hamis pozitív aránya 12 % (7/58) és 16 % (9/56), hamis negatív aránya pedig 0 % (0/27) és 12 % (3/26) közé kerül.
45. Ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja is szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozónak, a BCOP vizsgálat adatai – a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból vagy megfelelően validált más *in vitro* vizsgálatból származó adatokkal együtt – jól használhatók annak további meghatározásában, hogy a BCOP vizsgálat mennyire és milyen korlátokkal alkalmas a nem súlyos irritációt okozó, illetve az irritációt nem okozó anyagok azonosítására (jelenleg folyik egy útmutató elkészítése az *in vitro* szemtoxicitás-vizsgálati módszerekre vonatkozóan).

**A vizsgálat elfogadási kritériumai**

46. A vizsgálat akkor elfogadható, ha a pozitív kontrollanyaghoz tartozó IVIS érték az aktuális (legalább háromhavonta, illetőleg az ilyen vizsgálatot havi egy alkalomnál ritkábban végző laboratóriumok esetében minden elfogadható vizsgálat után aktualizált) történeti átlagtól legfeljebb a szórás kétszeresének megfelelő mértékben tér el. A negatív kontrollanyagon és az oldószeren/vivőanyagon megfigyelt hatásokhoz tartozó opacitás- és permeabilitásvértékeknek kisebbnek kell lenniük az adott negatív kontrollanyaggal vagy oldószerrel/vivőanyaggal kezelt szarvasmarha-szaruhártyára megállapított felső háttéropacitás- és háttérpermeabilitás-korlátnál.

**Vizsgálati jegyzőkönyv**

47. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

*Vizsgált anyag és kontrollanyagok*

Kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, ha vannak

A CAS szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám), ha ismert

Az anyag vagy keverék tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), a rendelkezésre álló információknak megfelelően

Fizikai-kémiai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, pH, stabilitás, kémiai osztály, vízben való oldhatóság, ha a vizsgálat szempontjából relevánsak

A vizsgált anyag és a kontrollanyagok kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés)

Stabilitás, ha ismert

*A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai*

A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe

A szemek beszerzési helyének (a létesítmény, ahonnan származnak) megjelölése

A szemek tárolásának és szállításának körülményei (pl. a szemek begyűjtésének napja és időpontja, a vizsgálat megkezdéséig eltelt idő, a szállítóeszköz és a hőmérsékleti viszonyok, az alkalmazott antibiotikumok)

Azon egyedek jellemzői, amelyekből a szemek származnak (pl. a donorállat életkora, neme, tömege), ha rendelkezésre állnak

*Az alkalmazott vizsgálati módszer és protokoll indokolása**A vizsgálati módszer integritása*

A vizsgálati módszer időbeli integritásának (például pontosságának, megbízhatóságának) biztosítására alkalmazott módszer (például jártassági tesztanyagokon végzett időszakos vizsgálatok, negatív és pozitív történeti kontrolladatok felhasználása)

*A vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai*

Az elfogadható párhuzamos pozitív és negatív kontrolladatok tartománya a történeti adatok alapján

Az elfogadható párhuzamos referencia-kontrolltartományok a történeti adatok alapján, szükség szerint

*Vizsgálati körülmények*

Az alkalmazott vizsgálati elrendezés leírása

Az alkalmazott szaruhártyatartó típusa

Az opacitás és a permeabilitás mérésére használt műszerek (pl. opaciméter és spektroszkóp) kalibrálási adatai

A felhasznált szarvasmarha-szaruhártya adatai, megállapítások a minőségükre vonatkozóan

Az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei

A vizsgált anyagok alkalmazott koncentrációja (koncentrációi)

A vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása

Utalás a modellel kapcsolatos történeti adatokra (pl. negatív és pozitív kontrollanyagok, jártassági tesztanyagok, referenciaanyagok)

Az alkalmazott értékelési kritériumok leírása

#### *Eredmények*

A megvizsgált minták adatai egyenként, táblázatos formában (pl. a vizsgált anyag, a pozitív, a negatív és a referencia-kontrollanyag [ha volt] opacitás- és OD<sub>490</sub> értékei táblázatos formában, ideértve az esetleg megismételt azonos mérések adatait, valamint az egyes mérések középértékeit és szórásait is)

A megfigyelt egyéb jelenségek leírása

*Az eredmények szöveges elemzése*

*Következtetések*

#### **IRODALOM**

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

- (2) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

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

[[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. Elektronikus formátumban:

[<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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Elektronikus formátumban:

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

- (6) Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről, HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Elektronikus formátumban:

[[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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Elektronikus formátumban:
- [[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. Elektronikus formátumban:
- [[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. Elektronikus formátumban:
- [<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 Test Method. Elektronikus formátumban:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.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. Elektronikus formátumban:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)]

---

### 1. függelék

#### FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Pontosság:** A vizsgálati eredmény és az elfogadott referenciaérték közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer hatékonyságát mutatja, és alkalmazhatóságának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

**Referenciaanyag:** A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: (i) állandó és megbízható beszerzési forrással vagy forrásokkal kell rendelkeznie; (ii) a vizsgált anyagosztályhoz hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; (iii) ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; (iv) rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és (v) a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

**Szaruhártya:** A szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

**Szaruhártya opacitása:** A szaruhártyának a vizsgált anyaggal való behatást követő átlátszatlanságát leíró jellemző. Az opacitás megnövekedése a szaruhártya károsodását jelzi. Az opacitás értékelése történhet szubjektív módon (mint például a nyulakon végzett Draize-féle szemvizsgálatban) vagy objektív módszerrel (műszerrel, például opaciméterrel).

**Szaruhártya permeabilitása:** A szaruhártya felhámjának károsodását leíró számadat; meghatározása a szaruhártya összes sejtrétegén áthatoló fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérése alapján történik.

**EPA szerinti 1. kategória:** Szemkorrózió (visszafordíthatatlan pusztulás a szem szöveteiben) vagy 21 napnál hosszabb ideig fennálló szaruhártya-elváltozás vagy -irritáció (1).

**EU szerinti R41. kategória:** A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (2).

**Hamis negatív arány:** A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

**Hamis pozitív arány:** A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

**GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere):** Anyagoknak és keverékeknek a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkaadók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segítségnyújtók) és a környezet megóvása érdekében egységesítse az anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (3).

**GHS szerinti 1. kategória:** A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (3).

**Veszély:** Anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy élő szervezettel, rendszerrel vagy (al)populációval való találkozásakor káros hatásokat képes előidézni.

**In vitro irritációs pontszám (IVIS):** A BCOP vizsgálatban alkalmazott, kísérleti úton származtatott összefüggés, amely az egyes kezelt csoportok opacitásának és permeabilitásának középértékeit minden egyes kezelt csoportra egyetlen *in vitro* pontszám formájában fejezi ki. IVIS = átlagopacitás + (15 x átlagpermeabilitás).

**Negatív kontroll:** A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen rendszer. Ez a minta összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapítható, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

**Szemirritációt nem okozó anyag:** Az EPA szerinti I., II. vagy III., az EU szerinti R41. vagy R36., illetve a GHS szerinti 1., 2.A. vagy 2.B. kategóriába nem tartozó anyag.

**Szemkorróziót okozó anyag:** (a) A szemben visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozó anyag; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába tartozó, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

**Szemirritációt okozó anyag:** (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása visszafordítható elváltozást okoz; (b) az EPA szerinti II. vagy III., az EU szerinti R36., illetve a GHS szerinti 2.A. vagy 2.B. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

**Súlyos szemirritációt okozó anyag:** (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása a behatást követően 21 napon belül nem gyógyuló szövetkárosodást okoz vagy a látás súlyos fizikai romlását okozza; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

**Opaciméter:** A szaruhártya fényátbocsátását kvantitatív módon értékelő, a szaruhártya opacitásának mérésére alkalmazott műszer. Rendszerint két kamrából áll, amelyek mindegyike saját fényforrással és fotocellával van ellátva. Az egyik kamrában helyezkedik el a kezelt szaruhártya, míg a másik a műszer kalibrálására és alaphelyzetbe állítására szolgál. Egy kontrollrekeszt (folyadékkal nem töltött üres kamra ablakok nélkül) halogénlámpa fényével átvilágítanak, a fényt fotocellával érzékelik, és ezt összevetik a szaruhártyát tartalmazó kamrát magában foglaló vizsgálati rekeszen átvezetett, a fotocellával érzékelt fénnel. A fotocellák segítségével mért fényerősségek összehasonlításából adódó számszerű opacitás-érték digitális kijelzőn jelenik meg.

**Pozitív kontroll:** A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, a hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

**Megbízhatóság:** Vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatósága ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumok közötti megismételhetőség kiszámításával történik.

**Oldószeres/vivőanyagos kontroll:** A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó kezeletlen rendszer, amely összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapíthatók az ugyanazon oldószerben oldott vagy vivőanyaggal felvitt vizsgált anyag kiindulási értékei. E kontroll negatív elvégzett párhuzamos vizsgálatával az is megállapítható, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

**Többszintű vizsgálat:** Olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgált anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintjük, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének mérlegelésével meghatározzuk, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi besorolásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

**Validált vizsgálati módszer:** Olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága ellenőrző vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást.

**Az adatok bizonyító erejének mérlegelése:** Az a folyamat, amelynek során az adott anyag veszélyességével kapcsolatban rendelkezésre álló érveket és ellenérveket a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából részletesen áttekintjük.

---

## 2. függelék

### Jártassági tesztanyagok a BCOP vizsgálatához

Az e vizsgálati módszerre támaszkodó vizsgálati módszerek rutinszerű alkalmazásának megkezdése előtt célszerű lehet, ha a laboratórium az 1. táblázat szerinti tíz anyagon ellenőrzi a szemkorroziót okozó anyagok azonosításában való technikai jártasságát. Ezen anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatok (TG 405.) alapján a lokális szemirritáció/szemkorrozió (ENSZ GHS szerinti 1., 2.A. és 2.B. kategória, valamint a „nem besorolt és címkézett” kategória) szempontjából reprezentatívak legyenek (3) (7). Azonban e vizsgálatok validált alkalmazási körét (kizárólag a szemkorroziót, illetőleg súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) figyelembe véve besorolási célból a jártasság igazolása csak két vizsgálati kimenetelre (szemkorroziót vagy súlyos szemirritációt okozó, illetve szemkorroziót, illetve súlyos szemirritációt nem okozó) értelmezhető. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rájuk vonatkozóan rendelkezésre, és kiváló minőségű referenciaadatok álljanak rendelkezésre abból a két in vitro vizsgálati módszerből is, amelyek tekintetében folyik a vizsgálati útmutató kidolgozása. Ennek megfelelően az anyagok az ICCVAM által az in vitro szemtoxicitási vizsgálati módszer validálásához ajánlott 122 irritatív referenciaanyagból kerültek kiválasztásra (lásd Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances) (5). A referenciaadatok megtalálhatók a BCOP vizsgálatra és az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszerre (ICE vizsgálat) vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (17) (18).

## 1. táblázat

Ajánlott tesztanyagok a BCOP vizsgálatban való technikai jártasság ellenőrzéséhez

| Anyag                    | CASRN     | Kémiai osztály <sup>(1)</sup> | Halmazállapot | <i>In vivo</i> besorolás <sup>(2)</sup> | <i>In vitro</i> besorolás <sup>(3)</sup>       |
|--------------------------|-----------|-------------------------------|---------------|---|--|
| Benzalkonium-klorid (5%) | 8001-54-5 | Óniumvegyület                 | Folyadék      | 1. kategória                            | Szemkorrozíót /súlyos irritációt okozó         |
| Klórhexidin              | 55-56-1   | Amin, amidin                  | Szilárd       | 1. kategória                            | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt okozó     |
| Dibenzoil-L-borkősav     | 2743-38-6 | Karbonsav, észter             | Szilárd       | 1. kategória                            | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt okozó     |
| Imidazol                 | 288-32-4  | Heterociklikus                | Szilárd       | 1. kategória                            | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt okozó     |
| Triklórecetsav (30%)     | 76-03-9   | Karbonsav                     | Folyadék      | 1. kategória                            | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt okozó     |
| 2,6-Diklórbenzoil-klorid | 4659-45-4 | Savhalogenid                  | Folyadék      | 2.A. kategória                          | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt nem okozó |
| Etil-2-metilaceto-acetát | 609-14-3  | Keton, észter                 | Folyadék      | 2.B. kategória                          | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt nem okozó |
| Ammónium-nitrát          | 6484-52-2 | Szervetlen só                 | Szilárd       | 2.A. kategória                          | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt nem okozó |
| Glicerín                 | 56-81-5   | Alkohol                       | Folyadék      | Nem címkézett                           | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt nem okozó |
| n-Hexán                  | 110-54-3  | Szénhidrogén (aciklikus)      | Folyadék      | Nem címkézett                           | Szemkorrozíót /súlyos szemirritációt nem okozó |

Rövidítések: CASRN = a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

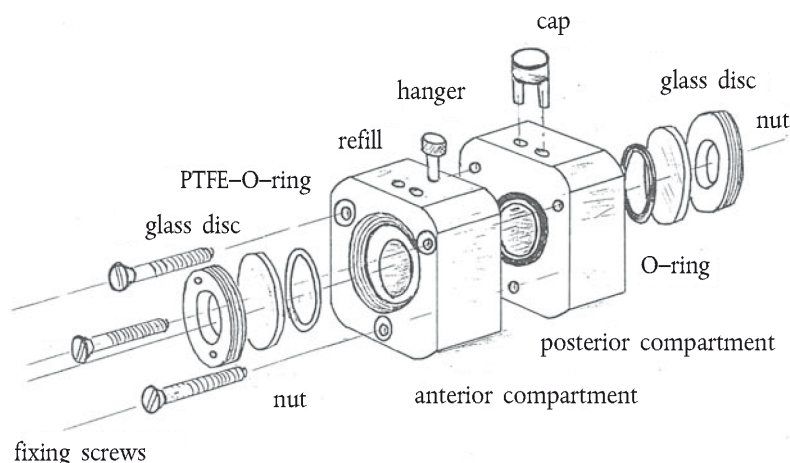
<sup>(1)</sup> A kémiai osztály meghatározása standard besorolási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings” (MeSH) elnevezésű besorolási rendszere alapján (elektronikus formátumban: <http://www.nlm.nih.gov/mesh> címen) történt.<sup>(2)</sup> A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (OECD TG 405) eredményei alapján és az ENSZ GHS felhasználásával (3) (7).<sup>(3)</sup> BCOP- és ICE-eredmények alapján.

## 3. függék

## SZARUHÁRTYATARTÓ A BCOP VIZSGÁLATHOZ

1. A BCOP vizsgálatához alkalmazott szaruhártyatartó inert anyagból (például polipropilénből) készül. A tartók két részből (elülső és hátsó kamrából) állnak, és két, egymáshoz hasonló hengeres belső kamrával rendelkeznek. Mindkét kamra 5 ml térfogatú és üvegablakban végződik, amelyen keresztül az opacitást mérik. Mindkét belső kamra átmérője 1,7 cm, mélysége 2,2 cm. <sup>(1)</sup> A szivárgás megelőzésére a hátsó kamrában egy tömítőgyűrű található. A szaruhártyákat a belhími oldalukkal lefelé kell a hátsó kamra tömítőgyűrűjére fektetni, majd az elülső kamrákat a szaruhártyák felhími oldalára kell elhelyezni. A kamrákat a kamrák külső peremén található három, korrózióálló acélból készült csavar rögzíti. Az egyes kamrák végén üvegablak található, amely a szaruhártyához való könnyebb hozzáférés érdekében eltávolítható. A szivárgás megelőzésére az üvegablak és a kamra között is van egy tömítőgyűrű. Mindegyik kamra tetején két nyílás található, amelyen keresztül betölthető és üríthető a közeg és a vizsgált anyag. A kezelési és az inkubációs időszak alatt ezeket a nyílásokat gumikupak zárja le.

<sup>(1)</sup> A megadott méretek 12–60 hónapos tehenekhez használt szaruhártyatartókon alapulnak. 6–12 hónapos egyedek esetében a tartót úgy kell kialakítani, hogy mindkét kamra térfogata 4 ml, a belső kamrák átmérője 1,5 cm, mélysége pedig 2,2 cm legyen. Új típusú szaruhártyatartók esetében nagyon fontos, hogy a vizsgált anyagnak kitett szaruhártya-felület és a hátsó karma térfogatának hányadosa megegyezzen a hagyományos szaruhártyatartó hasonló adatával. Ez azért szükséges, hogy az IVIS javasolt képletébe beírandó permeabilitáskétekek helyesen legyenek meghatározva.



#### Szószedet

Glass disc: Üveglemez

PTFE-O-ring: PTFE tömítőgyűrű

Refill: Töltőnyílás

Hanger: Rögzítőelem

Cap: Kupak

Nut: Csavaranya

O-ring: Tömítőgyűrű

Posterior compartment: Hátsó kamra

Anterior compartment: Elülső kamra

Fixing screws: Rögzítőcsavarok

#### AZ OPACIMÉTER

2. Az opaciméter a fényátbocsátás mérésére szolgáló műszer. Egy kontrollrekeszt (folyadékkal nem töltött üres kamra ablakok nélkül) halogénlámpa fényével átvilágítanak, a fényt fotocellával érzékelik, és ezt összevetik a szaruhártyát tartalmazó kamrát magában foglaló vizsgálati rekeszen átvezetett, a fotocellával érzékelt fénnel. A fotocellák segítségével mért fényerősségek összehasonlításából adódó számszerű opacitásérték digitális kijelzőn jelenik meg. Ennek alapján történik az opacitásjegységek megállapítása.
3. Az opaciméternek az előrejelző modellben leírt különféle besorolásokhoz tartozó határértékek által kijelölt tartományokban (vagyis a szemkorrozíót, illetve a súlyos irritatív hatást meghatározó határértékig) lineáris viselkedést kell tanúsítania. Annak érdekében, hogy a leolvasások 75–80 opacitásjegységig lineárisak és pontosak legyenek, az opacimétert több kalibrátorral kell kalibrálni. A kalibrátorokat (opálos polieszter lapokat) a kalibrációs kamrába (a kalibrátorok tartására átalakított szaruhártyakamrába) kell helyezni, és leolvasást kell végezni az opaciméteren. A kalibrációs kamrákat úgy kell kialakítani, hogy a kalibrátorok a fényforrástól és a fotocellától ugyanolyan távolságra helyezkedjenek el, mint a szaruhártyák az opacitásmérés során. Az opacimétert először üres kalibrációs kamrával a zérus opacitásjegységre kell kalibrálni. A három különböző kalibrátort ezután egyenként be kell helyezni a kalibrációs kamrába, és mérni kell az opacitást. Az első, a második és a harmadik kalibrátor behelyezésekor rendre az előre beállított 75, 150 és 225 ( $\pm 5\%$  tűrés) opacitásjegységet kell tudni leolvasni.

**B.48. IZOLÁLT CSIRKESZEM VIZSGÁLATÁN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA****BEVEZETÉS**

1. Az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer (a továbbiakban: ICE vizsgálat) olyan in vitro vizsgálati módszer, amely bizonyos körülmények között és bizonyos korlátok mellett felhasználható anyagok és vegyületek »szemkorrozíót és súlyos szemirritációt okozóként« történő besorolására (1) (2) (3). E vizsgálati módszer alkalmazásában súlyos szemirritációt okozó anyagok azok az anyagok, amelyek a nyulak esetében a felvitelt követően legalább 21 napon át tartó szemléziókat okoznak. Noha a vizsgálat nem váltja ki teljes mértékben a nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatot, az ICE vizsgálat alkalmazása a szabályozói követelmények szerinti besorolás és címkézés egy adott alkalmazási területen történő meghatározására szolgáló, többszintű vizsgálati stratégia részeként ajánlott (4) (5). A vizsgálatban pozitív eredményt adó vizsgált anyagok és keverékek (6) nyulakon végzett további vizsgálatok nélkül »szemkorrozíót vagy súlyos szemirritációt okozó« besorolást kaphatnak. Azokat az anyagokat, amelyek vizsgálata negatív eredményt adott, az OECD 405. vizsgálati iránymutatásában (e melléklet B.5. fejezete) (7) leírtak szerint lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával nyulakon végzett további vizsgálatoknak kell alávetni.
2. E vizsgálati módszer célja a vizsgált anyag szemkorrozíót vagy súlyos szemirritációt okozó esetleges hatásának kimutatása annak alapján, hogy a csirkéből eltávolított csirkeszemben milyen mértékben vált ki toxikus hatást. A szaruhártyára gyakorolt toxikus hatások jellemzése (i) az opacitás kvalitatív értékelésével, (ii) a szembe juttatott fluoreszcein következtében bekövetkező felhámkárosodás (fluoreszcein-visszatartás) kvalitatív értékelésével, (iii) a megvastagodás (felfúvódás) kvantitatív mérésével és (iv) a felület makroszkopikus morfológiai károsodásának kvalitatív értékelésével történik. A szaruhártya vizsgált anyagnak való expozícióját követően megállapítható szaruhártya-opacitást, felfúvódást és károsodást külön-külön jellemezzük, majd ezekből a jellemzőkből együttesen származtatjuk az ún. szemirritációs osztályt.
3. Az ICE vizsgálat 21 napnál rövidebb idő alatt gyógyuló szemléziókat kiváltó szemirritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagokat is vizsgáltak. Az ezekbe a kategóriákba tartozó anyagok tekintetében azonban nem történt meg az ICE vizsgálat pontosságának és megbízhatóságának formális értékelése.
4. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

**KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK**

5. E vizsgálati módszer alapja az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) ICE vizsgálati protokollja (8), amelynek kidolgozása az alternatív módszerek validálásával foglalkozó európai, illetve japán központ (ECVAM, JCVAM), valamint a hollandiai TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology kutatószervezet részvételével végrehajtott nemzetközi validációs vizsgálat (4) (5) (9) alapján történt. A protokoll alapját publikált protokollokból származó információk, valamint a protokoll alkalmazása kapcsán a TNO-nál szerzett tapasztalatok képezik (10) (11) (12) (13) (14).
6. A módszer azonosított korlátai az alkoholok esetében tapasztalt hamis pozitív arányokon és a szilárd és a felületaktív anyagok esetében tapasztalt hamis negatív arányon alapulnak (lásd a 47. pontot) (4). Ha az említett kémiai és fizikai osztályokba tartozó anyagokat kizárjuk az adatbázisból, akkor az ICE vizsgálat pontossága az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerében egyaránt jelentősen javul (4). A vizsgálat célját (azaz kizárólag a szemkorrozíót, illetve súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) is figyelembe véve a hamis negatív arányok jelentősége nem kritikus, hiszen az érintett anyagokat a szabályozói követelményektől függően – az adatok bizonyító erejének mérlegelésével, lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával – később nyulakon vagy más, megfelelően validált in vitro vizsgálatokkal is megvizsgálják. Emellett a jelenleg rendelkezésre álló validációs adatbázis nem teszi lehetővé egyes kémiai osztályok vagy termékcsoportok (például a keverékek) megfelelő értékelését. A vizsgálat végrehajtója azonban a vizsgálati módszer alkalmazását valamennyi típusú anyag vizsgálata esetében (beleértve a keverékeket is) fontolóra veheti, a pozitív eredmény ugyanis ilyenkor is elfogadható lehet a szemkorrozíó, illetve a súlyosan irritatív hatás jelzésére. Az alkoholok esetében azonban a kapott pozitív eredményeket a túlzó előrejelzés kockázata miatt óvatosan kell értelmezni.
7. A csirkeszemmel végzett valamennyi eljárás során be kell tartani a vizsgáló intézménynek az emberi és az állati eredetű anyagok – ideértve többek között a szöveteket és a szöveti folyadékokat – kezelésére vonatkozó rendelkezéseit és eljárásait. Ajánlott továbbá követni az általános laboratóriumi óvintézkedéseket is (15).
8. A vizsgálati módszernek korlátja, hogy noha figyelembe vesz egyes szemre gyakorolt, a nyulakon végzett szemirritációs vizsgálatban elemzett hatásokat, illetve bizonyos fokig azok súlyosságát is, nem veszi figyelembe a kötőhártya- és az íriszsérüléseket. Másrészt, noha maga az ICE vizsgálat nem alkalmas a szaruhártya-léziók visszafordíthatóságának értékelésére, a nyulakon végzett szemvizsgálatok alapján korábban javasolták, hogy a szaruhártya-sérülés kezdeti mélységének értékelése alkalmas lehet a visszafordíthatatlan és a visszafordítható hatások megkülönböztetésére (16). Végezetül az ICE vizsgálat nem alkalmas a szembe kerülés következtében fellépő szisztémás toxicitási potenciál megítélésére.
9. Továbbra is folyik a munka az ICE vizsgálat nem súlyos irritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagok azonosítására való használhatósága, valamint korlátai részletesebb leírása érdekében (lásd még a 48. pontot is). A felhasználókat bátorítjuk arra, hogy mintákat és/vagy adataikat küldjék meg a validáló szervezeteknek, ezzel ugyanis segíthetik az ICE vizsgálat jövőbeli felhasználásainak (ideértve a nem súlyos szemirritációt okozó, illetve a szemirritációt nem okozó anyagok azonosítását is) formális értékelését.



10. Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, a 2. függelékben felsorolt jártassági teszt-anyagok felhasználásával ajánlatos meggyőződni felkészültségéről. Mielőtt a laboratórium az ICE vizsgálat adatait a szabályozói követelmények szerinti veszélyességi besorolás céljaira rendelkezésre bocsátaná, a vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja a BCOP vizsgálat elvégzésében való jártasságát.

#### A VIZSGÁLAT ELVE

11. Az ICE vizsgálat olyan organotipikus módszer, amely rövid távon in vitro fenntartja a csirkeszem működését. A módszerrel a vizsgált anyag által okozott károsodás jellemzése a szaruhártya felduzzadásának, opacitásának és károsodásának értékelése útján történik. Míg e két utóbbi paraméter kvalitatív értékelést igényel, a szaruhártya felduzzadásának jellemzése kvantitatív módszerrel történik. A mérési eredményeket vagy kvantitatív pontszámmá transzformáljuk, amely az átfogó jellemzést adó irritációs index kiszámításához szükséges, vagy kvalitatív jellemzés formájában fejezzük ki, amely a vizsgált anyag in vitro szemkorrozíót és súlyos szemirritációt okozó hatású anyagként történő besorolására szolgál. Ezt követően e két eredmény bármelyike felhasználható a vizsgált anyag in vivo szemkorrozíót és súlyos szemirritációt okozó hatásának előrejelzésére (lásd a döntési kritériumokat).

#### A csirkeszemek származása és életkora

12. A múltban a vizsgálatához vágóhídról beszerzett, emberi fogyasztás céljából leölt csirkékből nyert szemeket használtak, ami biztosította, hogy nem kellett laboratóriumi állatokat tartani. Csak az emberi élelmiszerláncba való bekerülésre alkalmas, egészséges állatokból nyert szemek használhatóak fel.
13. Bár a csirkék optimális életkorának meghatározása céljából nem végeztek átfogó ellenőrzött vizsgálatot, a vizsgálat céljára igénybe vett csirkék életkora és tömege a hagyományosan vágóhídra kerülő vágócsirkék életkorának és tömegének felel meg (kb. 7 hetes, 1,5–2,5 kg tömegű csirkék).

#### A szemek begyűjtése és beszállítása a laboratóriumba

14. A csirke elkábítását (mely rendszerint elektromos sokkal történik) és a nyak kivézetési célú bemetszését követően a fejet azonnal el kell távolítani. Annak érdekében, hogy a csirkefejeket a vágóhídról a károsodás és/vagy bakteriális fertőzés megelőzéséhez szükséges gyorsasággal a laboratóriumba lehessen szállítani, a laboratórium közelében helyi beszerzési forrást célszerű találni. A fejek begyűjtése és a szemeknek az ICE vizsgálatban való felhasználása között eltelt időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie (mindennek rendszerint két órán belül meg kell történnie), és igazolni kell, hogy ez az idő nem befolyásolja a vizsgálat eredményeit, azaz a szemek kiválasztási kritériumait, valamint a pozitív és negatív kontrollminták eredményeit. A vizsgálatban felhasznált valamennyi szemnek egy meghatározott napon begyűjtött szemállományból kell származnia.
15. Mivel a szemeknek a fejből való kimetszése a laboratóriumban történik, az egész fejeket szobahőmérsékleten, izotóniás sóoldattal nedvesített törülközőkkel párasított műanyag dobozokban kell a vágóhídról a laboratóriumba szállítani.

#### Az ICE vizsgálatban felhasznált szemek kiválasztási kritériumai

16. A vizsgálatból ki kell zárni azokat a szemeket, amelyek esetében a kivételt követően nagy (0,5-nél nagyobb) a fluoreszceines foltosodás kiindulási értéke vagy a szaruhártya-opacitási pontszám.
17. Minden kezelt csoportnak és pozitív kontrollcsoportnak legalább három szemből kell állnia. A negatív, illetve – ha az oldószer nem sóoldat – az oldószeres kontrollcsoportnak legalább egy szemből kell állnia.

#### ELJÁRÁS

##### A szemek előkészítése

18. A szemhéjat óvatosan bemetsszük, ügyelve arra, hogy elkerüljük a szaruhártya sérülését. Ezután a szaruhártya épségét a szaruhártya felületére néhány másodpercre felvitt, majd izotóniás sóoldattal leöblített, egy cseppnyi 2 vegyes százalékos (m/V) fluoreszcein-nátrium alkalmazásával gyorsan értékeljük. A fluoreszceinnel kezelt szemeket ezután réslámpás mikroszkóppal megvizsgáljuk, és ellenőrizzük, hogy a szaruhártya nem sérült-e meg (a fluoreszcein-visszatartási és a szaruhártya-opacitási pontszám legfeljebb 0,5 lehet).
19. Ha a szem sérüléstől mentes, akkor eltávolítjuk a koponyából, ügyelve arra, hogy elkerüljük a szaruhártya sérülését. A szemgolyót – a pislogóhártyát sebészeti csipesszel feszesen tartva – kihúzzuk a szemüregből, és a szemizmokat tompa hegyű hajlított ollóval átvágjuk. Fontos, hogy ne fejtünk ki olyan erős nyomást, amely károsíthatja a szaruhártyát (nyomásos szövetelváltozás következhet be).
20. Amikor a szemet a szemüregből eltávolítjuk, a szemidegből egy szabad szemmel is jól látható részt rajta hagyunk. A szemet a szemüregből való eltávolítást követően nedvszívó párnára helyezzük, majd levágjuk róla a pislogóhártyát és az egyéb kötőszöveteket.

21. A kivett szemet korrózióálló acél csíptetőre erősítjük úgy, hogy a szaruhártya függőleges helyzetben legyen. A csíptetőt ezt követően behelyezzük a szuperfúziós készülék egyik kamrájába (16). A csíptetőt a szuperfúziós készülékben úgy kell elhelyezni, hogy az izotóniás sóoldat cseppjei a teljes szaruhártyát ériék. A szuperfúziós készülék kamráinak hőmérsékletét  $32 \pm 1,5$  °C-on kell tartani. A 3. függelék bemutatja a szuperfúziós készülék jellemző kialakítását és a szemcsíptetőket; ezek az eszközök kereskedelmi forgalomban is kaphatók, de saját használatra is megépíthetők. A készülék az egyes laboratóriumok igényeinek (például a vizsgálandó szemek számának) megfelelően módosítható.
22. A szemeket a szuperfúziós készülékbe való behelyezés után ismét megvizsgáljuk réslámpás mikroszkóppal annak ellenőrzésére, hogy az előkészítés során nem sérültek-e meg. A réslámpás mikroszkóp mélységmérőjével ekkor a szaruhártya legmagasabb pontján megmérjük a szaruhártya vastagságát is. Nem vizsgálhatók tovább azok a szemek, (i) amelyeknek fluoreszcein-visszatartási pontszáma 0,5-nél nagyobb, (ii) amelyeknek szaruhártya-opacitása 0,5-nél nagyobb, valamint (iii) amelyek a károsodás bármely további jelét mutatják. Az e szempontok alapján ki nem zárt szemek közül ki kell zárni mindazokat, amelyek szaruhártya-vastagsága az összes szem középértékétől 10 %-kal nagyobb mértékben eltér. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a réslámpás mikroszkópok különböző résbeállítások esetén eltérő szaruhártya-vastagságot adhatnak. A részélességet 0,095 mm-re kell állítani.
23. Valamennyi szem megvizsgálása és jóváhagyása után a szemeket körülbelül 45–60 percig inkubálni kell annak érdekében, hogy a vizsgálandó anyag felvitele előtt a rendszerrel ekvilibrálódjanak. Az ekvilibrációs idő eltelte után fel kell jegyezni a kiindulási (azaz a zérus időpillanatban érvényes) szaruhártya-vastagságot és opacitást. A fluoreszcein-visszatartás végpontban kiindulási értéként az előkészítéskor meghatározott fluoreszcein-pontszámot kell figyelembe venni.

#### **A vizsgált anyag felvitele**

24. A kiindulási referenciamérések után a szemeket (tartójukkal együtt) azonnal ki kell venni a szuperfúziós készülékből, vízszintes helyzetbe kell hozni, majd fel kell vinni a vizsgált anyagot a szaruhártyára.
25. A folyadékokat általában hígítatlan állapotban vizsgáljuk, de szükség esetén (például ha a vizsgálat leírása így rendelkezik) hígítás is alkalmazható. Hígítás esetén lehetőleg fiziológiás sóoldatot alkalmazunk. Ellenőrzött körülmények között másféle oldószer is használható, a fiziológiás sóoldattól eltérő oldószerek megfelelőségét azonban külön igazolni kell.
26. A folyékony vizsgált anyagot úgy vesszük fel a szaruhártya felületére, hogy a szaruhártya teljes felületét egyenletesen beborítsa. A szabványos térfogat 0,03 ml.
27. A szilárd anyagokat lehetőleg dörzscsészében, mozsárban vagy hasonló őrleeszközben a lehető legfinomabbra őröljük. A port úgy vesszük fel a szaruhártya felületére, hogy a vizsgált anyag egyenletesen fedje azt be. A szabványos mennyiség 0,03 g.
28. A vizsgált anyagot (akár folyékony, akár szilárd) 10 másodpercig hagyjuk hatni, majd szobahőmérsékleten leöblítjük kb. 20 ml izotóniás sóoldattal. Ezt követően a szemet (tartójával együtt) az eredeti függőleges helyzetben visszahelyezzük a szuperfúziós készülékbe.

#### **Kontrollanyagok**

29. Minden vizsgálatban párhuzamosan negatív vagy oldószeres/vivőanyagos kontrollt és pozitív kontrollt is kell végezni.
30. Hígítatlan folyadékok és szilárd anyagok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése céljából és annak biztosítására, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást, az ICE vizsgálatban párhuzamos negatív kontrollanyagként fiziológiás sóoldatot kell alkalmazni.
31. Hígított folyadékok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése céljából és annak biztosítására, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást, az ICE vizsgálatban párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollt kell alkalmazni. A 25. pontnak megfelelően csak olyan oldószer, illetőleg vivőanyag alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra.

32. Annak ellenőrzése érdekében, hogy a kiváltott hatás valóban megfelelő-e, a vizsgálatnak mindig tartalmaznia kell egy ismert szemirritációt okozó anyaggal végzett párhuzamos pozitív kontrollvizsgálatot is. Mivel az ICE vizsgálat célja a szemkorroziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása, a pozitív kontrollanyagnak olyan referencia-anyagnak kell lennie, amely ebben a vizsgálatban súlyos hatást vált ki. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, az irritatív hatás nem lehet túlságosan erőteljes. A pozitív kontrollanyagra vonatkozóan megfelelő mennyiségű in vitro adatot kell létrehozni úgy, hogy meghatározható legyen a pozitív kontrollanyag statisztikailag meghatározott elfogadható tartománya. Ha egy adott pozitív kontrollanyagra vonatkozóan nincs elegendő korábbi adat az ICE vizsgálat alkalmazásából, akkor ezen adatok előállításához külön vizsgálatok lehetnek szükségesek.
33. Folyékony vizsgált anyagok esetében pozitív kontrollanyagként például 10 %-os ecetsav vagy 5 %-os benzalkónium-klorid, szilárd vizsgált anyagok esetében például nátrium-hidroxid vagy imidazol alkalmazható.
34. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyianyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

### Mért végpontok

35. A kezelt szaruhártyákat a kezelés előtt, majd a kezelést követő leöblítés után 30, 75, 120, 180 és 240 perc ( $\pm 5$  perc) elteltével értékeljük. Ezek az időpontok a négyórás behatási időn belül megfelelő mennyiségű mérést adnak, miközben a mérések között elegendő idő áll rendelkezésre valamennyi szem szükséges vizsgálatának elvégzéséhez.
36. Az értékelt végpontok: a szaruhártya opacitása, felduzzadása, fluoreszcein-visszatartása és morfológiai elváltozásai (például a felhám benyomódása vagy fellazulása). A fluoreszcein-visszatartás kivételével (amelyet csak a kezelés előtt és a vizsgált anyagnak való expozíció után 30 perccel határozzunk meg) minden végpontot valamennyi fenti időpontban meg kell határozni.
37. A szaruhártya opacitásának, fluoreszcein-visszatartásának, morfológiai elváltozásainak és – ha vizsgáljuk – hisztopatológiájának dokumentálására ajánlott fényképeket készíteni.
38. A négy óra elteltével végrehajtott utolsó vizsgálatot követően ajánlatos a szemeket az esetleges hisztopatológiai vizsgálathoz megfelelő fixálóban (például semleges puffert formalinban) tartani.
39. A szaruhártya felduzzadását a réslámpás mikroszkóp optikai pachométerével végzett szaruhártyavastagság-mérésekből határozzuk meg. A felduzzadást százalékban fejezzük ki, és a következő képletből, a mért szaruhártya-vastagságok felhasználásával számítjuk (a képletben  $t_c$  a vizsgált időpillanathoz,  $t_{c0}$  pedig a  $t = 0$  időpillanathoz tartozó szaruhártya-vastagságot jelenti):

$$\left( \frac{\text{szaruhártya-vastagság a vizsgált időpillanatban} - \text{szaruhártya-vastagság a zérus időpillanatban}}{\text{szaruhártya-vastagság a zérus időpillanatban}} \right) \times 100$$

40. Minden megfigyelési időpontban meghatározzuk az összes vizsgált szem szaruhártya-felduzzadásának középértékét. Az összes időpontban megfigyelt szaruhártyafelduzzadás-középértékek maximuma alapján minden vizsgált anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot rendelünk.
41. A szaruhártya-opacitási pontszámot a szaruhártya legsűrűbben opálos területe alapján kell megállapítani. Minden megfigyelési időpontban meghatározzuk az összes vizsgált szem szaruhártya-opacitásának középértékét. Az összes időpontban megfigyelt szaruhártyaopacitás-középértékek maximuma alapján minden vizsgált anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot rendelünk (1. táblázat).

1. táblázat

Szaruhártya-opacitási pontszámok

| Pontszám | Megfigyelés               |
|----------|---------------------------|
| 0        | Nincs opálosodás          |
| 0,5      | Nagyon halvány opálosodás |

| Pontszám | Megfigyelés   |
|----------|---|
| 1        | Szórt vagy zavaros területek; az írisz részletei tisztán kivehetőek   |
| 2        | Könnyen észrevehető áttetsző terület; az írisz részletei kissé elmosódottak                                   |
| 3        | Súlyos szaruhártya-opálosodás; az írisznek egyetlen részlete sem vehető ki, a pupilla mérete alig érzékelhető |
| 4        | A szaruhártya teljes opálosodása; az írisz nem látható  |

42. Kizárólag a 30 perc elteltével végzett megfigyelés alkalmával meghatározzuk az összes szem fluoreszcein-visszatartásának középértékét, és ennek alapján minden vizsgált anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot rendelünk (2. táblázat).

## 2. táblázat

### Fluoreszcein-visszatartási pontszámok

| Pontszám | Megfigyelés   |
|----------|---|
| 0        | Nincs fluoreszcein-visszatartás                                       |
| 0,5      | Igen csekély mértékű, egysejtes foltosodás                            |
| 1        | Egysejtes foltosodás elszórtan a szaruhártya kezelt felületén         |
| 2        | Fokális vagy egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás                    |
| 3        | A szaruhártya nagy egybefüggő területei tartanak vissza fluoreszceint |

43. A morfológiai elváltozások között megemlíthető a szaruhártya felhámsejtjeinek »benyomódása«, a felhám »fellazulása«, a szaruhártya felületének »érdesedése« és a vizsgált anyag »feltapadása« a szaruhártya felületére. Ezek a megfigyelések különböző súlyosságúak lehetnek, és egyidejűleg is előfordulhatnak. A megfigyelések besorolása a vizsgálatot végző személy szubjektív megítélésétől függ.

## ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

### Az adatok értékelése

44. A szaruhártya opacitását, felduzzadását és fluoreszcein-visszatartását külön-külön értékeljük, és az egyes végpontokhoz külön-külön ICE-osztályt állapítunk meg. Ezt követően az egyes végpontokhoz tartozó ICE-osztályok együttes figyelembevételével meghatározzuk az egyes vizsgált anyagok irritációs besorolását.

### Döntési kritériumok

45. Az egyes végpontok értékelését követően az ICE-osztályok megállapítását előre meghatározott tartományok alapján végezzük. A szaruhártya-vastagság (3. táblázat), az opacitás (4. táblázat) és a fluoreszcein-visszatartás (5. táblázat) jellemzése a következő skálákon, négy ICE-osztály figyelembevételével történik:

## 3. táblázat

### A szaruhártya-vastagság besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

| Szaruhártya-felduzzadás középértéke (%) (*)                  | ICE-osztály |
|--|-------------|
| 0-tól 5-ig   | I.          |
| 5-nél nagyobb, 12-ig   | II.         |
| 12-nél nagyobb, 18-ig (a kezelés után több mint 75 perccel)  | II.         |
| 12-nél nagyobb, 18-ig (a kezelés után legfeljebb 75 perccel) | III.        |
| 18-nál nagyobb, 26-ig  | III.        |

| Szaruhártya-felduzzadás középértéke (%) (*)                  | ICE-osztály |
|--|-------------|
| 26-nál nagyobb, 32-ig (a kezelés után több mint 75 perccel)  | III.        |
| 26-nál nagyobb, 32-ig (a kezelés után legfeljebb 75 perccel) | IV.         |
| 32 felett  | IV.         |

(\*) A szaruhártya-felduzzadás pontszámai csak akkor érvényesek, ha a vastagság mérése I. sz. mélységmérővel felszerelt Haag-Streit BP900 réslámpás mikroszkóppal és 9½-re (0,095 mm) állított résszélességgel történt. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a réslámpás mikroszkópok különböző résbeállítás esetén eltérő szaruhártya-vastagságot adhatnak.

#### 4. táblázat

Az opacitás besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

| A maximális opacitáspontszámok középértéke (*) | ICE-osztály |
|--|-------------|
| 0,0–0,5  | I.          |
| 0,6–1,5  | II.         |
| 1,6–2,5  | III.        |
| 2,6–4,0  | IV.         |

(\*) Lásd az 1. táblázatot.

#### 5. táblázat

A fluoreszcein-visszatartás középértékének besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

| Fluoreszcein-visszatartás középértéke a kezelés után 30 perccel (*) | ICE-osztály |
|---|-------------|
| 0,0–0,5   | I.          |
| 0,6–1,5   | II.         |
| 1,6–2,5   | III.        |
| 2,6–3,0   | IV.         |

(\*) Lásd a 2. táblázatot.

46. A vizsgált anyag általános in vitro irritációs besorolását a szaruhártya opacitása, felduzzadása és fluoreszcein-visszatartása alapján meghatározott kategóriák alapján, a 6. táblázatban bemutatott séma szerint állapítjuk meg.

#### 6. táblázat

Összesített in vitro irritációs besorolás

| Besorolás   | A három végpont kombinációi   |
|---|---|
| Szemkorróziót / súlyos szemirritációt okozó anyag | <p>3 × IV.<br/> 2 × IV., 1 × III.<br/> 2 × IV., 1 × II. (*)<br/> 2 × IV., 1 × I. (*)</p> <p>30 percnél a szaruhártya opacitása legalább 3 (legalább két szem esetében)<br/> Bármely időpontban a szaruhártya opacitása 4 (legalább két szem esetében)<br/> A felhám súlyos fellazulása (legalább egy szem esetében)</p> |

(\*) Kevésbé valószínű kombinációk.

47. Mint az 1. pontban láttuk, ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja szemkorrozíót vagy súlyos szemirritációt okozónak, akkor a besorolás és a címkézés céljára további vizsgálatokat kell végezni. A nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatból származó, az EPA (1), az EU (2) vagy a GHS (3) besorolási rendszer szerint osztályozott adatokkal összehasonlítva az ICE vizsgálat általános pontossága a szemkorrozíót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása tekintetében 83 % (120/144) és 87 % (134/154) között, hamis pozitív aránya 6 % (7/122) és 8 % (9/116) között, hamis negatív aránya pedig 41 % (13/32) és 50 % (15/30) között van. Ha az adatbázisból egyes meghatározott kémiai (alkoholok, felületaktív anyagok) és fizikai (szilárd anyagok) osztályokat kizárunk, akkor az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerben az ICE vizsgálat pontossága 91 % (75/82) és 92 % (69/75), hamis pozitív aránya 5 % (4/73) és 6 % (4/70), hamis negatív aránya pedig 29 % (2/7) és 33 % (3/9) közé kerül (4).
48. Ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja is szemkorrozíót vagy súlyos szemirritációt okozónak, az ICE vizsgálat adatai – a nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatból vagy megfelelően validált más in vitro vizsgálatból származó adatokkal együtt – jól használhatók annak további meghatározásában, hogy az ICE vizsgálat mennyire és milyen korlátokkal alkalmas a nem súlyos irritációt okozó, illetve az irritációt nem okozó anyagok azonosítására (jelenleg folyik egy útmutató elkészítése az in vitro szemtoxicitás-vizsgálati módszerekre vonatkozóan).

#### **A vizsgálat elfogadási kritériumai**

49. A vizsgálat akkor elfogadható, ha a szemirritáció szempontjából az egyidejű negatív vagy vívőanyag/oldószeres kontroll irritációt nem okozónak, az egyidejű pozitív kontroll súlyos irritációt /korrozíót okozónak bizonyul.

#### **Vizsgálati jegyzőkönyv**

50. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

##### *Vizsgált anyag és kontrollanyagok*

Kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, ha vannak

A CAS szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám), ha ismert

Az anyag vagy keverék tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), a rendelkezésre álló információknak megfelelően

Fizikai-kémiai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, pH, stabilitás, kémiai osztály, vízben való oldhatóság, ha a vizsgálat szempontjából relevánsak

A vizsgált anyag és a kontrollanyagok kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés)

Stabilitás, ha ismert

##### *A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai*

A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe

A szemek beszerzési helyének (pl. a létesítmény, ahonnan származnak) megjelölése

A szemek tárolásának és szállításának körülményei (pl. a szemek begyűjtésének napja és időpontja, a vizsgálat megkezdéséig eltelt idő)

Azon egyedek jellemzői, amelyekből a szemek származnak (pl. a donorállat életkora, neme, tömege), ha rendelkezésre állnak

##### *Az alkalmazott vizsgálati módszer és protokoll indoklása*

##### *A vizsgálati módszer integritása*

A vizsgálati módszer időbeli integritásának (például pontosságának, megbízhatóságának) biztosítására alkalmazott módszer (például jártassági tesztanyagokon végzett időszakos vizsgálatok, negatív és pozitív történeti kontrolladatok felhasználása)



*A vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai*

Az elfogadható párhuzamos referencia-kontrolltartományok a történeti adatok alapján, szükség szerint

*Vizsgálati körülmények*

Az alkalmazott vizsgálati elrendezés leírása

Az alkalmazott réslámpás mikroszkóp (pl. modellszám)

Az alkalmazott réslámpás mikroszkóp beállításai

A felhasznált csirkeszemek adatai, megállapítások a minőségükre vonatkozóan

Az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei

A vizsgált anyagok alkalmazott koncentrációja (koncentrációi)

A vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása

Utalás a modellel kapcsolatos történeti adatokra (pl. negatív és pozitív kontrollanyagok, jártassági tesztanyagok, referenciaanyagok)

Az alkalmazott értékelési kritériumok leírása

*Eredmények*

A megfigyelt egyéb jelenségek leírása

A szemekről készült fényképek (ha vannak)

Az eredmények szöveges elemzése

*Következtetések***IRODALOM**

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: US Environmental Protection Agency.
- (2) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353, 2008.12.31., 1. o.
- (3) United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Elektronikus formátumban:

[[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. Elektronikus formátumban:

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmer.htm](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. Elektronikus formátumban:

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

- (6) Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről, HL L 396, 2006.12.30., 1. o.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Elektronikus formátumban:
- [[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. 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. Elektronikus formátumban:
- [[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. Elektronikus formátumban:
- [[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). Elektronikus formátumban:
- [<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. Elektronikus formátumban:
- [<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. Elektronikus formátumban:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.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. Elektronikus formátumban:
- [[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. függelék

## FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Pontosság:** A vizsgálati eredmény és az elfogadott referenciaérték közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer hatékonyságát mutatja, és alkalmazhatóságának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

**Referenciaanyag:** A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: (i) állandó és megbízható beszerzési forrással vagy forrásokkal kell rendelkeznie; (ii) a vizsgált anyagosztályhoz hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; (iii) ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; (iv) rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és (v) a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

**Szaruhártya:** A szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

**Szaruhártya opacitása:** A szaruhártyának a vizsgált anyaggal való behatást követő átlátszatlanságát leíró jellemző. Az opacitás megnövekedése a szaruhártya károsodását jelzi.

**Szaruhártya felduzzadása:** Az ICE vizsgálatban a szaruhártyának a vizsgált anyaggal való érintkezését követő felpuffadása mértékét objektív módon jellemző érték. Százalékban fejezzük ki, és a szaruhártya-vastagság kiindulási (a vizsgált anyag felvitele előtti) értékéből és az ICE vizsgálat során a vizsgált anyagnak való expozíciót követően rendszeres időközönként végzett mérésekből számítjuk. A szaruhártya felduzzadásának foka jelzi a szaruhártya károsodásának mértékét.

**EPA szerinti 1. kategória:** Szemkorrozó (a szem szöveteiben visszafordíthatatlan pusztulást okoz) vagy 21 napnál hosszabb ideig fennálló szaruhártya-eltávolítás vagy -irritáció (1).

**EU szerinti R41. kategória:** A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (2).

**Hamis negatív arány:** A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

**Hamis pozitív arány:** A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

**Fluoreszcein-visszatartás:** Az ICE vizsgálatban a szaruhártya felhámsejtjeiben a vizsgált anyagnak való expozíciót követően visszatartott fluoreszcein-nátrium mennyiségét szubjektív módon jellemző adat. A fluoreszcein-visszatartás foka utal a szaruhártyafelhám károsodásának mértékére.

**GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere):** Anyagoknak és keverékeknek a fizikai, egészségi és környezeti kockázatok szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkaadók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse az anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (3).

**GHS szerinti 1. kategória:** A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (3).

**Veszély:** Anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy élő szervezettel, rendszerrel vagy (al)populációval való találkozásakor káros hatásokat képes előidézni.

**Negatív kontroll:** A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen rendszer. Ez a minta összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapítható, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

**Szemirritációt nem okozó anyag:** Az EPA szerinti I., II. vagy III., az EU szerinti R41. vagy R36., illetve a GHS szerinti 1., 2.A. vagy 2.B. kategóriába nem tartozó anyag (1) (2) (3).

**Szemkorrozíót okozó anyag:** (a) A szemben visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozó anyag; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába tartozó, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

**Szemirritációt okozó anyag:** (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása visszafordítható elváltozást okoz; (b) az EPA szerinti II. vagy III., az EU szerinti R36., illetve a GHS szerinti 2.A. vagy 2.B. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

**Súlyos szemirritációt okozó anyag:** (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása a behatást követően 21 napon belül nem visszafordítható szövetkárosodást okoz vagy a látás súlyos fizikai romlását okozza; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

**Pozitív kontroll:** A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, a hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

**Megbízhatóság:** Vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatósága ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumok közötti megismételhetőség kiszámításával történik.

**Réslámpás mikroszkóp:** A szem binokuláris mikroszkóp nagyítása alatti, álló sztereoszkópiás kép alkotásával történő közvetlen vizsgálatára alkalmazott műszer. Az ICE vizsgálatban a műszert a csirkeszem elülső szerkezeteinek, illetve a mélységmérő tartozékkal a szaruhártya vastagságának objektív mérésére használjuk.

**Oldószeres/vivőanyagok kontroll:** A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó kezeletlen rendszer, amely összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapíthatók az ugyanazon oldószerben oldott vagy vivőanyaggal felvitt vizsgált anyag kiindulási értékei. E kontroll negatív kontrollal elvégzett párhuzamos vizsgálatával az is megállapítható, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

**Többszintű vizsgálat:** Olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgált anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintjük, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének mérlegelésével meghatározzuk, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi besorolásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

**Validált vizsgálati módszer:** Olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága ellenőrző vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást.

**Az adatok bizonyító erejének mérlegelése:** Az a folyamat, amelynek során az adott anyag veszélyességével kapcsolatban rendelkezésre álló érveket és ellenérveket a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából részletesen áttekintjük.

## 2. függelék

## JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK AZ ICE VIZSGÁLATHOZ

Az e vizsgálati módszere támaszkodó vizsgálati módszerek rutinszerű alkalmazásának megkezdése előtt célszerű lehet, ha a laboratórium az 1. táblázat szerinti tíz anyagon ellenőrzi a szemkorrozíót okozó anyagok azonosításában való technikai jártasságát. Ezen anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatok (TG 405.) alapján a lokális szemirritáció/szemkorrozó (ENSZ GHS szerinti 1., 2.A. és 2.B. kategória, valamint a „nem besorolt és címkézett” kategória) szempontjából reprezentatívak legyenek (3) (7). Azonban e vizsgálatok validált alkalmazási körét (kizárólag a szemkorrozíót, illetve súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) figyelembe véve besorolási célból a jártasság igazolása csak két vizsgálati kimenetelre (szemkorrozíót vagy súlyos szemirritációt okozó, illetve szemkorrozíót, illetve súlyos szemirritációt nem okozó) értelmezhető. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rájuk vonatkozóan rendelkezésre, és kiváló minőségű referenciaadatok álljanak rendelkezésre abból a két *in vitro* vizsgálati módszerből is, amelyek tekintetében folyik a vizsgálati útmutató kidolgozása. Ennek megfelelően az anyagok az ICCVAM által az *in vitro* szemtoxicitási vizsgálati módszer validálásához ajánlott 122 irritatív referenciaanyagból kerültek kiválasztásra (lásd Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances List) (4). A referenciaadatok megtalálhatók a szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszerre (BCOP vizsgálat) és az ICE vizsgálatra vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (18) (19).

## 1. táblázat

Ájánlott tesztanyagok az ICE vizsgálatban való technikai jártasság ellenőrzéséhez

| Vegyí anyag               | CASRN     | Kémiai osztály <sup>(1)</sup> | Halmazállapot | <i>In vivo</i> besorolás <sup>(2)</sup> | <i>In vitro</i> besorolás <sup>(3)</sup>      |
|---------------------------|-----------|-------------------------------|---------------|---|---|
| Benzalkonium-klorid (5 %) | 8001-54-5 | Óniumvegyület                 | Folyadék      | 1. kategória                            | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt okozó     |
| Klórhexidin               | 55-56-1   | Amin, amidin                  | Szilárd       | 1. kategória                            | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt okozó     |
| Dibenzoil-L-borkósav      | 2743-38-6 | Karbonsav, észter             | Szilárd       | 1. kategória                            | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt okozó     |
| Imidazol                  | 288-32-4  | Heterociklikus                | Szilárd       | 1. kategória                            | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt okozó     |
| Triklórecetsav (30 %)     | 76-03-9   | Karbonsav                     | Folyadék      | 1. kategória                            | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt okozó     |
| 2,6-Diklórbenzoil-klorid  | 4659-45-4 | Savhalogenid                  | Folyadék      | 2.A. kategória                          | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt nem okozó |
| Etil-2-metilacetoacetát   | 609-14-3  | Keton, észter                 | Folyadék      | 2.B. kategória                          | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt nem okozó |
| Ammónium-nitrát           | 6484-52-2 | Szervetlen só                 | Szilárd       | 2.A. kategória                          | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt nem okozó |
| Glicerín                  | 56-81-5   | Alkohol                       | Folyadék      | Nem címkézett                           | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt nem okozó |
| n-Hexán                   | 110-54-3  | Szénhidrogén (aciklikus)      | Folyadék      | Nem címkézett                           | Szemkorrozíót/súlyos szemirritációt nem okozó |

Rövidítések: CASRN = a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

<sup>(1)</sup> A kémiai osztály meghatározása standard besorolási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings” (MeSH) elnevezésű besorolási rendszere alapján (elektronikus formátumban: <http://www.nlm.nih.gov/mesh> címen) történt.

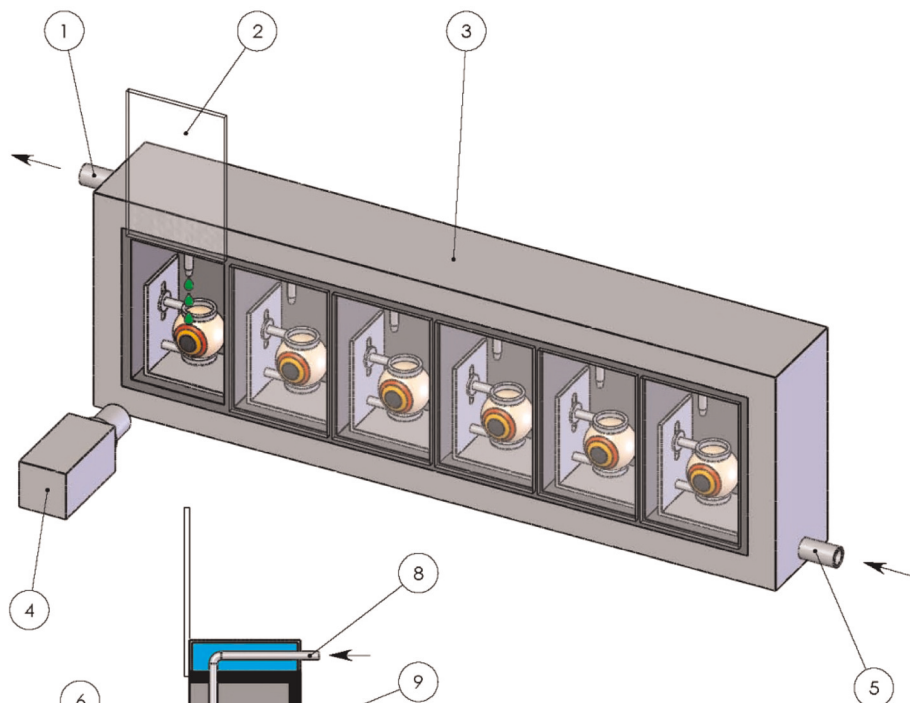
<sup>(2)</sup> A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (OECD TG 405) eredményei alapján és az ENSZ GHS felhasználásával (3) (7).

<sup>(3)</sup> BCOP- és ICE-eredmények alapján.

## 3. Függelék

**Szuperfúziós készülék és szemcsíptető az ICE vizsgálatához**

(A szuperfúziós készülék és a szemcsíptető további általános leírását lásd: Burton et al. (17))



KAMRA KERESZTMETSZETE

SZEMTARTÓ

| SORSZÁM | MEGNEVEZÉS             |
|---------|------------------------|
| 1       | MELEGVÍZ-KIFOLYÓNYÍLÁS |
| 2       | CSÚSZÓAJTÓ             |
| 3       | SZUPERFÚZIÓS KÉSZÜLÉK  |
| 4       | OPTIKAI MÉRŐMŰSZER     |
| 5       | MELEGVÍZ-BEFOLYÓNYÍLÁS |
| 6       | SÓOLDAT                |
| 7       | MELEG VÍZ              |
| 8       | SÓOLDAT-BEFOLYÓNYÍLÁS  |
| 9       | KAMRA                  |
| 10      | SZEMTARTÓ              |
| 11      | CSIRKESZEM             |
| 12      | SÓOLDAT-KIFOLYÓNYÍLÁS  |
| 13      | ÁLLÍTÓCSAVAR           |
| 14      | ÁLLÍTHATÓ FELSŐ KAR    |
| 15      | RÖGZÍTETT ALSÓ KAR     |