

KOMISIJAS REGULA (ES) Nr. 1152/2010**(2010. gada 8. decembris),****ar kuru, pielāgojot tehnikas attīstībai, groza Regulu (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH)****(Dokuments attiecas uz EEZ)**

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH), un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, 93/67/EEK, 93/105/EK un 2000/21/EK ⁽¹⁾, un jo īpaši tās 13. panta 3. punktu,

tā kā:

- (1) Komisijas Regulā (EK) Nr. 440/2008 ⁽²⁾ ir noteiktas Regulas (EK) Nr. 1907/2006 nolūkā piemērojamās testēšanas metodes vielu fizikāli ķīmisko īpašību, toksicitātes un ekotoksicitātes noteikšanai.
- (2) Regula (EK) Nr. 440/2008 ir jāatjaunina, iekļaujot tajā kā prioritāti divas jaunas *in-vitro* testēšanas metodes acu kairinājuma noteikšanai, ko nesen pieņēmusi ESAO, lai samazinātu izmēģinājumos izmantojamo dzīvnieku

skaitu atbilstīgi Padomes 1986. gada 24. novembra Direktīvai 86/609/EEK par dalībvalstu normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz to dzīvnieku aizsardzību, kurus izmanto izmēģinājumos un citiem zinātniskiem mērķiem ⁽³⁾. Par šo projektu ir rīkota apspriešanās ar ieinteresētajām personām.

- (3) Tāpēc attiecīgi jāgroza Regula (EK) Nr. 440/2008.
- (4) Šajā regulā noteiktie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi atbilstīgi Regulas (EK) Nr. 1907/2006 133. pantam izveidotā komiteja,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikuma B daļai pievieno šīs regulas pielikumā noteiktās nodaļas B.47 un B.48.

2. pants

Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2010. gada 8. decembrī

Komisijas vārdā –

priekšsēdētājs

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.

⁽²⁾ OV L 142, 31.5.2008., 1. lpp.

⁽³⁾ OV L 358, 18.12.1986., 1. lpp.

PIELIKUMS

"B. 47 LIELLOPU RADZENES DUĻĶOŠANĀS UN CAURLAIDĪBAS TESTĒŠANAS METODE NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS VAI NOPIETNU KAIRINĀJUMU IZRAISĪTĀJU VIELU IDENTIFICĒŠANAI

IEVADS

1. Liellopu radzenes duļķošanās un caurlaidības (BCOP) testēšanas metode *in vitro* ir noteikšanas metode, ko konkrētos apstākļos un ar noteiktiem ierobežojumiem var izmantot, lai vielas un to maisījumus klasificētu kā "nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu" izraisītājus (1) (2) (3). Šajā testēšanas metodē nopietnu kairinājumu izraisošām uzskata vielas, kas trušiem rada acu bojājumus, kuri neizzūd vismaz 21 dienas laikā pēc iedarbības. Kaut gan netiek uzskatīts, ka ar BCOP var pilnībā aizstāt iedarbības testu uz acīm *in vivo* ar trušiem, BCOP iesaka izmantot daudzpakāpju testēšanas stratēģijā, lai īpašas lietošanas jomā veiktu normatīvajos aktos reglamentēto klasifikāciju un marķēšanu (4) (5). Testējamās vielas un maisījumus (6) var klasificēt kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisošas, neveicot papildu testēšanu ar trušiem. Ar vielām, kuru testēšanas rezultāts ir negatīvs, jāveic izmēģinājumi izmantojot trušus pēc pakāpeniskas loģiski secīgas testēšanas stratēģijas saskaņā ar ESO testēšanas norādījumiem OECD Test Guideline 405 (7) (šī pielikuma B. 5. nodaļa).
2. Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai vērtētu testējamās vielas potenciālo nopietnus bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīto iedarbību uz acīm, ko mēra ar tās spēju izraisīt izolētas liellopu acs radzenes duļķošanās un palielināt tās caurlaidību. Toksisko iedarbību uz radzeni mēra ar šādiem parametriem: (i) gaismas caurlaidības samazināšanās (duļķošanās), (ii) krāsvielas fluoresceīna nātrija sāls caurlaidības palielināšanās (caurlaidība). Radzenes duļķošanās un caurlaidības vērtējumu pēc testējamās vielas iedarbības apvieno, lai noteiktu kairinājuma rādītāju *in vitro* (IVIS), ko izmanto testējamās vielas radītā kairinājuma pakāpes klasificēšanai.
3. Pēc BCOP testēšanas metodes ir testētas arī tāda acu kairinājuma izraisošas vielas, kura radītie bojājumi izzūd drīzāk nekā 21 dienas laikā, gan arī vielas, kurām nav kairinājumu izraisošas iedarbības. Tomēr BCOP testēšanas metodes pareizība un rezultātu ticamība šo kategoriju vielām nav formāli novērtēta.
4. Definīcijas sk. 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

5. Šīs testēšanas metodes pamatā ir Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komitejas (ICCVAM) BCOP testēšanas metodes protokols (8), kas tika izstrādāts pēc starptautiska validācijas pētījuma (4)(5)(9), kurā piedalījās Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (ECVAM) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (JaCVAM). Protokola pamatā ir informācija, kas iegūta no *In vitro* pētījumu institūta (IIVS) un INVITTOX protokola Nr. 124 (10), kurš atbilst Eiropas Kopienas sponsorētā 1997.-1998. gadā veiktā BCOP testa iepriekšējās validācijas pētījumā izmantotajam protokolam. Abu protokolu pamatā ir BCOP testēšanas metodika, ko pirmoreiz aprakstījuši Gautheron *et al.* (11).
6. Šīs testēšanas metodes apzinātie ierobežojumi ir liels kļūdains pozitīvo rezultātu procents spirtiem un ketoniem un liels kļūdains negatīvo rezultātu procents cietvielām validācijas datubāzē (sk. 44. punktu) (5). Ja no datubāzes izslēdz vielas, kas ietilpst šajās fizikālo un ķīmisko īpašību klasēs, BCOP precizitāte ES, EPA un GHS klasifikācijas sistēmās ievērojami uzlabojas (5). Pamatojoties uz šā testa nolūku (t.i., identificēt tikai nopietnus acu bojājumus / nopietnu kairinājumu izraisošas vielas), kļūdains negatīvo rezultātu procentam nav būtiskas nozīmes, jo šādas vielas pēc tam tiktu testētas izmēģinājumos ar trušiem vai izmantojot citus pietiekami validētus *in vitro* testus atkarībā no normatīvajos aktos noteiktajām prasībām, izmantojot secīgas testēšanas stratēģiju un citus attiecīgus datus. Turklāt patlaban esošā validācijas datubāze nedod iespējas pienācīgi novērtēt dažas ķīmisko vielu un produktu klases (piemēram, maisījumus). Taču var mēģināt izmantot šo testēšanas metodi visu veidu testējamajiem materiāliem (tostarp maisījumiem), ja pozitīvs rezultāts var būt pieņemams kā norāde par nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīto iedarbību. Taču par spirtiem un ketoniem iegūtie pozitīvie rezultāti jāinterpretē piesardzīgi pārvērtēšanas riska dēļ.
7. Visās procedūrās ar liellopu acīm un liellopu radzenēm testēšanas iestādēm jāievēro piemērojamie noteikumi un procedūras darbībām ar dzīvnieku izcelsmes materiāliem, pie kuriem pieder arī audi un audu šķidrumi. Bez tam ieteicams ievērot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā (12).
8. Lai gan testēšanas metodē tiek ņemti vērā daži iedarbības veidi uz acīm, kas tiek novērtēti truša acs kairinājuma testa metodē un zināmā mērā to smagums, tajā netiek ņemti vērā konjunktīvas un varavīksnienes bojājumi, kas ir šīs metodes ierobežojums. Kaut gan radzenes bojājumu atgriezeniskumu *per se* nevar novērtēt izmantojot BCOP testa metodi, pamatojoties uz izmēģinājumu rezultātiem ar trušiem, ierosināts neatgriezeniskas un atgriezeniskas iedarbības nošķiršanai izmantot radzenes bojājuma sākotnējā dziļuma novērtējumu (13). Visbeidzot, izmantojot BCOP metodi, nevar novērtēt ar iedarbību uz acīm saistītās sistēmiskās toksicitātes potenciālu.

9. Patlaban notiek darbs pie precīzāku raksturlielumu izstrādes BCOP metodes izmantošanas iespēju un ierobežojumu noteikšanā kairinājumu izraisīšu un kairinājumu neizraisīšu vielu identificēšanai (sk. arī 45. punktu). BCOP testēšanas metodes formālai novērtēšanai un iespējamo izmantošanas veidu noteikšanai, tostarp kairinājumu izraisīšu un kairinājumu neizraisīšu vielu identificēšanai, tās lietotāji tiek aicināti iesniegt validācijas organizācijām paraugus un/vai sniegt datus.
10. Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 2. papildinājumā norādītās standartvielas. Laboratorija šīs vielas var izmantot BCOP testēšanas metodes izpildes tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms BCOP testēšanas rezultātu datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

METODES PRINCIPS

11. BCOP testēšanas metode ir orgāntipisks modelis, kas īslaicīgi nodrošina iespēju saglabāt liellopu acs radzenes normālas fizioloģiskas un bioķīmiskas funkcijas *in vitro*. Šajā testēšanas metodē testējamās vielas radītos bojājumus novērtē, veicot radzenes duļķošanās un gaismas caurlaidības izmaiņu kvantitatīvus mērījumus attiecīgi ar opacitometru un redzamās gaismas spektrofotometru. Abus mērījumus izmanto IVIS aprēķināšanai, pēc kura nosaka kairinājuma izraisīšanas bīstamības klasifikācijas kategoriju *in vitro*, ko izmanto testējamās vielas acu kairinājumu izraisīšanas potenciāla *in vivo* prognozei (sk. sadaļu "Lēmuma pieņemšanas kritēriji").
12. BCOP testēšanas metodē tiek izmantotas tikko kautu liellopu acs izolētas radzenes. Radzenes duļķošanos mēra kvantitatīvi kā radzenes gaismas caurlaidību. Radzenes caurlaidību mēra kvantitatīvi kā krāsvielas fluoresceīna nātrija sāls daudzumu, kas iziet cauri visam radzenes slānim un ko nosaka aizmugurējā nodalījuma vidē. Testējamo vielu aplicē uz radzenes epitēlija virsmas, to iepildot radzenes turētāja priekšējā kamerā. 3. papildinājumā dots BCOP metodē izmantojamā radzenes turētāja apraksts un shēma. Radzenes turētāji ir gatavi nopērkami no dažādiem piegādātājiem, tos var izgatavot pašu spēkiem.

Liellopu acu iegūšanai izmantojamo dzīvnieku šķirnes un vecums

13. Uz kautuvēm nosūtītos liellopus parasti kauj izmantošanai patērīgam cilvēku pārtikā vai citām vajadzībām. Par cilvēkiem paredzētas pārtikai piemērotiem uzskata tikai veselīgus dzīvniekus, ko izmanto arī BCOP testā vajadzīgo radzeņu iegūšanai. Liellopu dzīvsvars atkarībā no šķirnes, vecuma un dzimuma var ievērojami atšķirties, tāpēc netiek noteikts ieteicamais dzīvnieka dzīvsvars kaušanas laikā.
14. Ja tiek izmantotas dažāda vecuma dzīvnieku acis, to radzeņu izmēri var atšķirties. No liellopiem, kas vecāki par astoņiem gadiem, parasti iegūst radzenes, kuru diametrs horizontāli ir > 30,5 mm un kuru biezums centrā (CCT) ir ≥ 1 100 μm, savukārt no liellopiem, kas ir jaunāki par pieciem gadiem, iegūst radzenes ar diametru horizontāli < 28,5 mm un CCT < 900 μm (14). Šā iemesla dēļ tāpēc parasti neizmanto par 60 mēnešiem vecāku liellopu acis. Parasti neizmanto arī par 12 mēnešiem jaunāku liellopu acis, jo tās vēl attīstās un radzenes biezums un diametrs ir ievērojami mazāki nekā pieaugušu liellopu acīm. Taču jaunlopu (t.i., 6 līdz 12 mēnešus vecu) radzenes ir pieļaujams izmantot, jo tām ir dažas priekšrocības, piemēram, lielāka pieejamība, mazs vecuma diapazons un mazāks darbinieku iespējamās saskares risks ar liellopu sūkļveida encefalopātiju (15). Tā kā būtu lietderīgi sīkāk novērtēt, kā radzenes lielums un biezums ietekmē tās reakciju uz nopietnus acu bojājumus/ nopietnu acu kairinājumu izraisītāju vielu iedarbību, lietotāji tiek rosināti norādīt to dzīvnieku aptuveno vecumu un/vai dzīvsvaru, no kuriem ņemtas testēšanai izmantotās radzenes.

Acu ņemšana un nogādāšana laboratorijā

15. Acis ņem kautuvju darbinieki. Lai pēc iespējas samazinātu acu mehāniskos un cita veida bojājumus, acis izņem iespējami drīz pēc dzīvnieka nonāvēšanas. Lai novērstu kairinājumu iespējami izraisīšu vielu iedarbību uz acīm, dzīvnieka galvas skalošanai nedrīkst izmantot detergentus.
16. Piemērota izmēra konteinerā acis pilnībā iegremdē Henksa šķīdumā (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) un nogādā laboratorijā tā, lai pēc iespējas samazinātu to bojāšanos un/vai bakteriālo kontamināciju. Tā kā acis tiek ņemtas kaušanas laikā, tās var būt pakļautas asiņu un citu bioloģisko materiālu, kā arī baktēriju u.c. mikroorganismu iedarbībai. Tāpēc ir svarīgi iespējami samazināt kontaminācijas risku (piemēram, turot konteineru ar acīm uz kūstoša ledus, un Henksa šķīdumam (HBSS), kurā acis atrodas transportēšanas laikā, pievienojot antibiotikas [piemēram, penicilīnu koncentrācijā 100 IU/mL un streptomīcinu koncentrācijā 100 μg/mL]).
17. Pēc iespējas samazina laiku no acu ņemšanas līdz radzeņu izmantošanai BCOP testā (parasti ņem un izmanto tajā pašā dienā), un uzskatāmi parāda, ka tam nav ietekmes uz testēšanas rezultātiem. Šo rezultātu pamatā ir acu izvēles kritēriji, kā arī atbildes reakcijas pozitīvajā un negatīvajā kontrolē. Visām testēšanā izmantotajām acīm ir jābūt no vienas noteiktā dienā ņemto acu grupas.

BCOP testam izmantojamo acu izvēles kritēriji

18. Pēc acu nogādāšanas laboratorijā uzmanīgi pārbauda, vai tām nav bojājumu, tostarp pārmērīgas duļķošanās, skrumbu vai neovaskularizācijas. Jāizmanto tikai tādu acu radzenes, kam nav šo bojājumu.
19. Vēlāk testēšanas procesā novērtē arī katras radzenes kvalitāti. Nav derīgas radzenes, kuru duļķošanās rādītājs pēc sākotnējās vienas stundas līdzsvarošanas perioda ir lielāks par septiņām duļķošanās vienībām (PIEZĪME: opacitometrs jākalibrē ar duļķainības kalibratoriem standartiem, kurus izmanto duļķošanās vienību noteikšanai, sk. 3. papildinājumu).
20. Katrā paraugu grupā (testējamā viela, paralēlas negatīvās un pozitīvās kontroles) jābūt vismaz trīs acīm. BCOP testa negatīvajai kontrolei izmanto trīs radzenes. Tā kā visas radzenes tiek izņemtas no acs ābola un iemontētas radzeņu kamerās, ir iespējami atsevišķu radzeņu duļķošanās un caurlaidības rādītāju artefakti (tostarp negatīvajā kontrolē). Turklāt, veicot IVIS aprēķinus, radzeņu, kam veic negatīvo kontroli, duļķošanās un caurlaidības vērtības tiek izmantotas to radzeņu duļķošanās un caurlaidības vērtību korekcijai, uz kurām iedarbojas ar testējamo vielu un izmanto pozitīvajai kontrolei.

PROCEDŪRA**Acu sagatavošana**

21. Nebojātas radzenes izpreparē kopā ar 2–3 mm platu cīpslenes daļu, lai atvieglotu turpmākās operācijas un nebojātu radzenes epitēliju un endotēliju. Izolētās radzenes nostiprina šim nolūkam paredzētos radzeņu turētājos, kas sastāv no priekšējā un aizmugurējā nodalījuma, kuri saskaras attiecīgi ar radzenes epitēlija un endotēlija virsmu. Abas kameras (vispirms aizmugurējo kameru) tā, lai neveidotos burbuļi, pilnībā piepilda ar siltu Īgla barotni (*Eagle's Minimum Essential Medium*, EMEM). Pēc tam vismaz vienu stundu ierīci iztur pie $32 \pm 1^\circ\text{C}$, lai stabilizētu tās temperatūru un radzene būtu līdzsvarā ar apkārtējo vidi, iespējami nodrošinot normālu metabolisko aktivitāti (radzenes virsmas temperatūra *in vivo* ir apmēram 32°C).
22. Pēc līdzsvarošanas abās kamerās iepilda svaigu siltu EMEM, un katrai radzenei nolasa sākotnējās duļķošanās rādījumus. Radzenes, kam tiek konstatēti makroskopiski audu bojājumi (piemēram, skrumbas, pigmentācija, neovaskularizācija) vai kuru duļķošanās rādītājs ir lielāks par 7 duļķošanās vienībām, nav derīgas. Aprēķina visu to radzeņu vidējo duļķošanos, kam veikta līdzsvarošana. Vismaz trīs radzenes, kuru duļķošanās vērtības ir tuvu visu radzeņu vidējai duļķošanās vērtībai, izmanto negatīvajai (jeb šķīdinātāju) kontrolei. Pārējās radzenes iedala testa un pozitīvās kontroles grupās.
23. Tā kā ūdens siltumietilpība ir lielāka par gaisa siltumietilpību, ūdens nodrošina stabilākus temperatūras apstākļus inkubācijai. Tāpēc radzenes turētāja un tā satura uzturēšanai $32 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūrā ieteicams izmantot ūdens vannu. Taču var izmantot arī inkubatorus ar gaisu, ja tiek veikti temperatūras stabilitātes uzturēšanai vajadzīgie pasākumi (piemēram, iepriekš sasildot turētājus un barotni).

Testējamās vielas aplicēšana

24. Izmanto divus dažādus apstrādes protokolus, vienu šķīdumiem un virsmaktīvām vielām (cietvielām vai šķīdumiem), bet otru cietvielām, kas nav virsmaktīvas.
25. Šķīdumu iedarbību testē neatšķaidot, bet virsmaktīvās vielas testē 10 % (masas) koncentrācijā 0,9 % nātrija hlorīda šķīduma, destilēta ūdens vai cita šķīdinātāja šķīdumā, par kuriem ir iegūtas liecības, ka tiem nav nevēlamas ietekmes uz testēšanas sistēmu. Pusšķīdus, krēmveida un vaskveida materiālus parasti testē šķīdumu veidā. Ja izmanto citu atšķaidīšanas koncentrāciju, tas ir attiecīgi jāpamato. Šķīdumu un virsmaktīvo vielu iedarbībai radzenes pakļauj 10 min. Ja izmanto citu iedarbības laiku, tam jāsniedz pienācīgs zinātnisks pamatojums.
26. Cietvielas, kas nav virsmaktīvas, parasti testē šķīdumu vai suspensiju veidā 20 % koncentrācijā 0,9 % nātrija hlorīda šķīduma, destilēta ūdens vai cita šķīdinātāja šķīdumā, par kuriem ir iegūtas liecības, ka tiem nav nevēlamas ietekmes uz testēšanas sistēmu. Zināmos apstākļos ar pienācīgu zinātnisku pamatojumu cietvielas var testēt tīrā veidā, izmantojot vaļējās kameras metodi (sk. 29. punktu), tās tieši aplicējot uz radzenes virsmas. Cietvielu iedarbībai radzenes pakļauj četras stundas, taču, tāpat kā šķīdumu un virsmaktīvu vielu gadījumā, ar pienācīgu zinātnisku pamatojumu drīkst izmantot citu iedarbības laiku.
27. Atkarībā no testējamās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām (piemēram, cietvielas, šķīdumi, viskozi un neviskozi šķīdumi) var izmantot dažādas aplicēšanas metodes. Galvenais ir nodrošināt, lai testējamā viela pienācīgi pārklātu epitēlija virsmu, un skalojot tā tiktu pienācīgi noskalota. Slēgtās kameras metodi parasti izmanto neviskozām vai nedaudz viskozām testējamām vielām, kas ir šķīdumi, bet vaļējās kameras metodi parasti izmanto daļēji viskozām un viskozām testējamajām vielām un cietvielām tīrā veidā.

28. Izmantojot slēgtās kameras metodi, pietiekamu daudzumu testējamās vielas (750 µL), ar ko var pārklāt radzenes epitēlija virsmu, ievieto priekšējā kamerā pa dozēšanas atverēm kameras augšpusē un atveres pēc tam uz iedarbības laiku noslēdz ar kameras aizbāžņiem. Svarīgi ir nodrošināt, lai katra radzene tiktu pakļauta testējamās vielas iedarbībai uz atbilstošu laiku.
29. Izmantojot vaļējās kameras metodi, pirms aplicēšanas noņem loga slēggredzenu un priekšējās kameras stikla lodziņu. Kontroles vai testējamo vielu (750 µL vai tādu testējamās vielas daudzumu, ar ko var pilnībā noklāt radzeni) aplicē tieši uz radzenes epitēlija virsmas ar mikropipeti. Ja testējamās vielas dozēšana ar pipeti ir apgrūtināta, to var zem spiediena iepildīt virzulpipetē, lai atvieglotu dozēšanu. Virzulpipetes uzgali ievieto šļirces dozēšanas uzgali, lai materiālu spiediena iedarbības rezultātā varētu iespiest dozēšanas uzgali. Vienlaikus, pipetes virzulim pārvietojoties augšup, tiek spiests šļirces virzulis. Ja pipetes uzgali parādās gaisa burbuļi, testējamo materiālu izņem (izspiež) un procesu atkārtoti, kamēr uzgali ir pilns un tajā nav gaisa burbuļu. Ja vajadzīgs, var izmantot parastu šļirci (bez adatas), jo ar to var izmērīt precīzu testējamās vielas tilpumu, un vielu ir vieglāk uzklāt radzenes epitēlija virsmai. Pēc aplicēšanas priekšējai kamerai ieliek stikla lodziņu, lai atkal izveidotu noslēgtu sistēmu.

Inkubēšana pēc iedarbības

30. Pēc iedarbības perioda testējamo, negatīvās kontroles vai pozitīvās kontroles vielu izņem no priekšējās kameras un epitēliju vismaz trīs reizes (vai kamēr vairs nav vizuāli novērojamas testējamās vielas paliekas) nomazgā ar EMEM (kas satur fenolsarkano). Barotni, kurā ir fenolsarkanais, izmanto skalošanai, jo fenolsarkanā krāsas izmaiņas var novērot, lai noteiktu skābu vai sārmainu materiālu noskalošanas efektivitāti. Radzenes mazgā vairāk nekā trīs reizes, ja fenolsarkanais nekrāsojas sarkans (ir dzeltenā vai violetā krāsā) vai ja ir redzamas testējamā materiāla atliekas. Kad barotnē vairs nav testējamās vielas, radzenes pēdējo reizi noskalo ar EMEM (bez fenolsarkanā). Pēdējā skalošanas reizē izmanto EMEM (bez fenolsarkanā), lai noskalotu fenolsarkano no priekšējās kameras pirms duļķošanās mērīšanas. Pēc tam priekšējo kameru no jauna piepilda ar svaigu EMEM, kas nesatur fenolsarkano.
31. Testējot šķidrums vai virsmaktīvas vielas, pēc skalošanas radzenes inkubē vēl divas stundas 32 ± 1 °C temperatūrā. Zināmos apstākļos var būt noderīgs ilgāks pēcdarbības laiks, kas jāņem vērā konkrētos gadījumos. Ar cietvielām apstrādātās radzenes pēc četrus stundu ilgā iedarbības perioda beigām rūpīgi noskalo, bet tām nav vajadzīga papildu inkubācija.
32. Pēc šķidrumu un virsmaktīvo vielu iedarbības paredzētā inkubācijas perioda beigām un, izņemot virsmaktīvas vielas, pēc četrus stundu ilgas cietvielu iedarbības novēro katras radzenes duļķošanās un caurlaidību. Katru radzeni apskata un reģistrē novērojumus (piemēram, audu nolobīšanās, testējamā materiāla atliekas, nevienmērīgas duļķošanās pazīmes). Šie novērojumi var būt svarīgi, jo ar tiem var būt izskaidrojamas opacitometra rādījumu atšķirības.

Kontroles vielas

33. Katrā eksperimentā iekļauj paralēlas negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles un pozitīvās kontroles.
34. Testējot vielu, kas ir šķidrums ar 100 % koncentrāciju, BCOP testēšanas metodē iekļauj paralēlu negatīvo kontroli (piemēram, 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumu vai destilētu ūdeni), lai varētu konstatēt neraksturīgas testēšanas sistēmas izmaiņas un testējamajiem beigu punktiem noteiktu sākotnējās vērtības. Tādējādi tiek arī nodrošināts, lai testēšanas apstākļu dēļ kā atbildes reakcija nepareizi netiktu konstatēts kairinājums.
35. Testējot atšķaidītu vielu, kas ir šķidrums, virsmaktīvo vielu vai cietvielu, BCOP testēšanas metodē iekļauj paralēlu šķīdinātāja/nesēja kontroles grupu, lai varētu konstatēt neraksturīgas testēšanas sistēmas izmaiņas un noteiktu mērāmo parametru sākotnējās vērtības. Drīkst izmantot tikai tādu šķīdinātāju/nesēju, par kuru iegūtas liecības, ka tam nav nevēlamas ietekmes uz testēšanas sistēmu.
36. Katrā eksperimentā kā paralēlu pozitīvo kontroli iekļauj testu ar acu kairinājumu izraisošu vielu, lai pārlicinātos, ka atbildes reakcija ir atbilstoša. Tā kā šajā testēšanas metodē BCOP tests tiek izmantots, lai identificētu acu nopietnus bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītās vielas, ideālā gadījumā pozitīvajai kontroles vielai būtu jābūt standarta vielai, kas šajā testēšanas metodē izraisa spēcīgu reakciju. Tomēr, lai nodrošinātu iespēju novērtēt pozitīvās kontroles reakcijas mainību laikā, kairinājuma reakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārmērīgi liela.
37. Pozitīvās kontroles piemēri testējamajām vielām, kas ir šķidrums, ir dimetilformamīds vai 1 % nātrija hidroksīda šķīdums. Pozitīvās kontroles piemērs testējamajām cietvielām ir 20 % (masas) imidazola šķīdums 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumā.

38. Salīdzināšanas vielas ir lietderīgi izmantot, lai novērtētu noteiktas nezināmu ķīmisko vielu vai produktu kategorijas potenciālu izraisīt acu kairinājumu vai novērtētu acu kairinājumu izraisošas vielas salīdzinošo spēju izraisīt noteiktas intensitātes kairinājuma reakcijas.

Mērāmie beigu punkti

39. Dulķošanas nosaka pēc radzenes gaismas caurlaidības. Radzenes dulķošanas mēra kvantitatīvi ar opacitometru, rezultātā iegūstot dulķošanās vērtības, kas ir nepārtraukti lielumi.
40. Caurlaidību nosaka pēc krāsvielas fluoresceīna nātrija sāls daudzuma, kas iziet cauri visiem radzenes šūnu slāņiem (t.i., no epitēlija uz radzenes ārējās virsmas līdz endotēlijam uz radzenes iekšējās virsmas). Radzenes turētāja priekšējo kamerā, kas saskaras ar radzenes epitēlija virsmu, iepilda 1 mL fluoresceīna nātrija sāls šķīduma (attiecīgi 4 vai 5 mg/mL, testējot šķīdumus un virsmaktīvās vielas vai cietvielas, kas nav virsmaktīvas), savukārt aizmugurējo kameru, kas saskaras ar radzenes endotēlija virsmu, piepilda ar svaigu EMEM. Pēc tam turētāju horizontālā stāvoklī 90 ± 5 min inkubē 32 ± 1 °C temperatūrā. Izmantojot UV/VIS spektrofotometriju, kvantitatīvi izmēra fluoresceīna nātrija sāls daudzumu, kas nonāk aizmugurējā kamerā. Spektrofotometriskos mērījumus veic pie 490 nm, reģistrē kā optiskā blīvuma (OD_{490}) vai absorbcijas vērtības, ko mēra kā nepārtrauktu lielumu. Fluoresceīna caurlaidības vērtības nosaka, izmantojot OD_{490} vērtības, izmantojot redzamās gaismas spektrofotometru ar standarta 1 cm optiskā ceļa garumu.
41. Var izmantot arī 96 iedobju mikrotitrēšanas plati, ja (i) var noteikt fluoresceīna OD_{490} vērtību noteikšanai izmantotās plates lasītāja lineāro diapazonu un (ii) lai iegūtu OD_{490} vērtības, kas ekvivalentas standarta 1 cm optiskā ceļa garumam, 96 iedobju platē tiek izmantoti pareiza tilpuma fluoresceīna paraugi (tam vajadzīga pilnībā pilna iedobe [parasti 360 µL]).

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Datu novērtēšana

42. Pēc dulķošanās un vidējās caurlaidības (OD_{490}) vērtību korekcijas, ņemot vērā fona dulķošanas un negatīvās kontroles caurlaidības OD_{490} vērtības, lai katrai testējamo paraugu grupai aprēķinātu *in vitro* kairinājuma rādītāju (IVIS) katras testējamās paraugu grupas vidējās dulķošanās un caurlaidības OD_{490} vērtības apvieno, izmantojot šādu empirisku formulu:

$$IVIS = \text{vidējā dulķošanās vērtība} + (15 \times \text{vidējā caurlaidības } OD_{490} \text{ vērtība})$$

Sina *et al.* (16) norāda, ka šī formula ir iegūta iekšlaboratoriju un starplaboratoriju pētījumos. Datim, kas, izmantojot 36 savienojumus, iegūti vairāku laboratoriju veiktā pētījumā, tika veikta daudzfaktoru analīze, lai iegūtu vienādojumu, kas vislabāk apraksta *in vivo* un *in vitro* datu savstarpējo sakarību. Šo analīzi veica divas atsevišķas zinātnieku grupas, iegūstot gandrīz identiskus vienādojumus.

43. Dulķošanās un caurlaidības vērtības jānovērtē arī neatkarīgi viena no otras, lai noteiktu, vai testējamā viela izraisījusi nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu tikai kāda viena testēšanas beigu punkta vai to abu dēļ (sk. sadaļu "Lēmuma pieņemšanas kritēriji").

Lēmuma pieņemšanas kritēriji

44. Vielu uzskata par nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīšu, ja tās iedarbības rezultātā izmērītais IVIS ir $\geq 55,1$. Kā noteikts 1. punktā, ja testējamā viela netiek identificēta kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīša, tās klasifikācijai un marķēšanai ir jāveic papildu testēšana. BCOP testēšanas metodes pareizība ir 79 % (113/143) līdz 81 % (119/147), kļūdaini pozitīvo rezultātu daļa ir no 19 % (20/103) līdz 21 % (22/103) un kļūdaini negatīvo rezultātu daļa ir no 16 % (7/43) līdz 25 % (10/40), salīdzinot ar datiem, kas iegūti pēc truša acu testēšanas metodes *in vivo*, kas klasificēti atbilstīgi EPA (1), ES (2) vai GHS (3) klasifikācijas sistēmai. Ja noteiktu ķīmisko (t.i., spirti, ketoni) vai fizikālo (t.i., cietvielas) īpašību grupas vielas izslēdz no dabubāzes, BCOP pareizība ES, EPA un GHS klasifikācijas sistēmā ir no 87 % (72/83) līdz 92 % (78/85), kļūdaini pozitīvo rezultātu daļa ir no 12 % (7/58) līdz 16 % (9/56) un kļūdaini negatīvo rezultātu daļa ir no 0 % (0/27) līdz 12 % (3/26).
45. Ja testējamo vielu neklasificē kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīšu, kopā ar truša acu testa *in vivo* vai cita atbilstīgi validēta *in vitro* testa datiem BCOP dati var būt noderīgi, lai turpmāk novērtētu BCOP testēšanas metodes piemērotību un ierobežojumus acu kairinājumu izraisīšu un acu kairinājumu neizraisīšu vielu testēšanai (patlaban tiek izstrādāts norādījumu dokuments par *in vitro* testēšanas metodēm, lai noteiktu toksitāti acīm).

Testa rezultātu pieņemamības kritēriji

46. Testēšanas rezultātu uzskata par pieņemamu, ja pozitīvajā kontrolē tiek iegūta IVIS vērtība, kas divkārtšas standartnovirzes robežās sakrīt ar tādas pašreizējo iepriekš iegūto vēsturisko datu vidējo vērtību, kura tiek atjaunināta vismaz reizi trīs mēnešos vai ikreiz, kad veic pieņemamu testu laboratorijās, kurās testēšanu izdara reti (t.i., retāk nekā reizi mēnesī). Negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles rezultātā jāiegūst tādas duļķošanās un caurlaidības vērtības, kas ir mazākas nekā liellopu radzenēm sākotnēji noteiktās fona duļķošanās un caurlaidības augstākās vērtības attiecīgajā negatīvajā vai šķīdinātāja/nesēja kontrolē.

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija, kas attiecas uz konkrēto noteikšanu:

Testējamās vielas un kontrolvielas

Ķīmiskais nosaukums(-i), piemēram, ķīmijas analītisko apskatu indeksā (*Chemical Abstracts Service, CAS*) izmantotais nosaukums, pēc tam citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi;

CAS reģistra numurs, ja tas ir zināms;

vielas vai maisījuma tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama;

fizikāli ķīmiskās īpašības, kas attiecas uz pētījuma veikšanu, piemēram, fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, vielas ķīmiskā klase, šķīdība ūdenī;

testējamās/kontroles vielu sagatavošana testēšanai, ja tiek veikta (piemēram, sildīšana, sasmalcināšana);

stabilitāte, ja zināma.

Informācija par sponzoru un testēšanas iestādi

Sponsora, testēšanas iestādes nosaukums, pētījuma vadītāja uzvārds un adrese;

norāde par acu ņemšanas vietu (t.i., iestāde, kur tās ņemtas);

Acu glabāšanas un transportēšanas apstākļi (piemēram, acu ņemšanas datums un laiks, līdz testēšanas sākumam pagājušais laiks, transportēšanas un temperatūras apstākļi, izmantotās antibiotikas);

īpašas to dzīvnieku pazīmes, no kuriem ņemtas acis, ja tādas ir pieejamas (piemēram, donordzīvnieka vecums, dzimums, svars).

*Izmantotās testēšanas metodes un protokola pamatojums**Testēšanas metodes integritāte*

Procedūra, ko izmanto, lai nodrošinātu testēšanas metodes integritāti (t.i., pareizību un ticamību) laikā (piemēram, periodiska standartvielu testēšana, iepriekš iegūto vēsturisko negatīvās un pozitīvās kontroles datu izmantošana).

Testa apstiprināšanas kritēriji

Pieņemams paralēlo pozitīvo un negatīvo kontroļu rezultātu diapazons, pamatojoties uz iepriekš iegūtajiem vēsturiskajiem datiem;

ja vajadzīgs, pieņemami paralēlo standarta kontroļu diapazoni, pamatojoties uz iepriekš iegūtajiem vēsturiskajiem datiem.

Testēšanas apstākļi

Izmantotās testēšanas sistēmas apraksts;

izmantotā radzenes turētāja tips;

informācija par duļķošanās un caurlaidības mērierīču (piemēram, opacimetra un spektrofotometra) kalibrēšanu;

informācija par izmantotajām liellopu radzenēm, tostarp liecības par to kvalitāti;

sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru;

testējamās vielas koncentrācija(-s);

testēšanas procedūras iespējamo modifikāciju apraksts;

atsauce uz vēsturiskajiem datiem par modeli (piemēram, negatīvās un pozitīvās kontroles, standartvielas, salīdzināšanas vielas);

izmantoto novērtējuma kritēriju apraksts.

Rezultāti

Tabulas veidā apkopotu datus par katru testējamo paraugu (piemēram, duļķošanās un OD₄₉₀ vērtības un aprēķinātais testējamās vielas IVIS, un pozitīvās, negatīvās un salīdzināšanas kontroles [ja paredzētas], pēc vajadzības iekļaujot datus no atkārtotiem eksperimentiem, un katrā eksperimentā iegūtā vidējā vērtība ± standartnovirze);

Novērojumu apraksts.

Rezultātu novērtējums

Secinājums

LITERATŪRA

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

- (2) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006. OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.

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

[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*. Pieejams:

[<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. Pieejams:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]

- (6) Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH), un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, 93/67/EEK, 93/105/EK un 2000/21/EK. OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.

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

[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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Pieejams:
- [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. Pieejams:
- [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. Pieejams:
- [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349:636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Pieejams:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]
- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Pieejams:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pēc testēšanas metodes iegūto mērījumu rezultātu sakritības pakāpe ar attiecīgajām references vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās piemērotības aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "sakritība" vai atbilstība, ar to domājot pareizo rezultātu daļu, ko iegūst pēc testēšanas metodes.

Salīdzināšanas viela: viela, ko izmanto kā standartu salīdzināšanai ar testējamo vielu. Salīdzināšanas vielai ir jābūt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs un uzticams ieguves avots, (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo vielu klases vielām, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem iedarbības veidiem un (v) vielas zināmais iedarbības stiprums atbilst vēlamās reakcijas intensitātes diapazonam.

Radzene: acs ābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīliti un ielaiž acī gaismu.

Radzenes dulķošanās: izmērītā radzenes dulķošanās pakāpe pēc testējamās vielas iedarbības. Radzenes dulķošanās palielināšanās norāda uz radzenes bojājumiem. Dulķošanos var novērtēt subjektīvi kā Dreizes (*Draize*) truša acu testā vai objektīvi, izmantojot instrumentu, piemēram, opacitometru.

Radzenes caurlaidība: kvantitatīvs radzenes epitēlija bojājumu mērījums, nosakot krāsvielas fluoresceīna nātrija sāls daudzumu, kas iziet cauri visām radzenes šūnu kārtām.

EPA 1. kategorija: nopietns acu bojājums (acs audu neatgriezeniska noārdīšana), radzenes bojājums vai izraisīts kairinājums, kas saglabājas ilgāk par 21 dienu (1).

ES R41 kategorija: acs audu bojājums vai nopietni fiziski redzes traucējumi, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un nav pilnīgi atgriezeniski 21 dienas laikā pēc aplicēšanas (2).

Kļūdaini negatīvo rezultātu daļa: visu to pozitīvo vielu daļa ar attiecīgu iedarbību, kas, izmantojot konkrēto testēšanas metodi, nepareizi identificēta kā negatīva viela, kurai šādas iedarbības nav. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Kļūdaini pozitīvo rezultātu daļa: visu to visu to negatīvo vielu daļa bez attiecīgas iedarbības, kas, izmantojot konkrēto testēšanas metodi, nepareizi identificētas kā pozitīvas vielas ar šādu iedarbību. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

GHS (Globāli harmonizētā ķīmisko vielu klasifikācijas un marķēšanas sistēma): sistēma, saskaņā ar kuru ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem kaitīgās iedarbības veidiem un to intensitātes uz cilvēka veselību un vidi, kā arī paredz atbilstošu saziņas elementu izmantošanu, piemēram, piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, piesardzības apzīmējumus un drošības datu lapas, kuru mērķis ir sniegt informāciju, kas nepieciešama cilvēku (tostarp darba devēju, strādājošo, transporta darbinieku, patērētāju un avārijas dienestu darbinieku) un vides aizsardzībai pret to kaitīgo iedarbību (3).

GHS 1. kategorija: acs audu bojājums vai nopietni fiziski redzes traucējumi, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas un kas nav pilnīgi atgriezeniski ilgāk par 21 dienu pēc vielas aplicēšanas (3).

Bīstamība: aģentam vai situācijai piemītoša īpašība, kas šā aģenta iedarbības rezultātā var radīt nevēlamu ietekmi uz attiecīgo organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

In vitro kairinājuma rādītājs (IVIS): pēc empīriskas formulas aprēķināts rādītājs, ko izmanto BCOP testā un kurā tiek apvienota katras paraugu grupas vidējā dulķošanās un vidējā caurlaidības vērtība, lai katrai grupai iegūtu vienu rezultātu *in vitro*. $IVIS = \text{vidējā dulķošanās vērtība} + (15 \times \text{vidējā caurlaidības vērtība})$.

Negatīvā kontrole: ar testējamo vielu neapstrādāts atkārtojums, kurā ir visi pārējie testēšanas sistēmas komponenti. Šo paraugu testē kopā ar paraugiem, uz kuriem aplicēta testējamā viela, un citiem kontroles paraugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājam ir mijiedarbība ar testēšanas sistēmu.

Kairinājumu neizraisoša viela: viela, kas netiek klasificēta kā EPA I, II vai III kategorijas, ES R41 vai R36 kategorijas, vai GHS 1., 2.A vai 2.B kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela.

Nopietnus acu bojājumus izraisoša viela: (a) viela, kas rada acs audu neatgriezenisku bojājumu; (b) viela, kas tiek klasificēta kā GHS 1. kategorijas, EPA I kategorijas vai ES R41 kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1) (2) (3).

Acu kairinājumu izraisoša viela: (a) viela, kas pēc aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas izraisa acī atgriezeniskas izmaiņas, (b) viela, kas tiek klasificēta kā EPA II vai III kategorijas, ES R36 kategorijas vai GHS 2.A vai 2.B kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1) (2) (3).

Nopietnu acu kairinājumu izraisošā viela: (a) viela, kas pēc aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas izraisa acs audu bojājumus, kas ir neatgriezeniski ilgāk par 21 dienu pēc aplicēšanas vai kas izraisa nopietnus fiziskus redzes traucējumus; (b) viela, kas tiek klasificēta kā GHS 1. kategorijas, EPA I kategorijas vai ES R41 kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1) (2) (3).

Opacitometrs: instruments, ko lieto, lai mēritu "radzenes duļķošanu", radzenes gaismas caurlaidības kvantitatīvai noteikšanai. Instrumentam parasti ir divi nodaļumi, katram savs gaismas avots un fotoelements. Vienā nodaļumā ievieto apstrādāto radzeni, bet otru izmanto instrumenta kalibrēšanai un nulles vērtību iestatīšanai. Halogēnlampas gaisma iet cauri kontroles nodaļumam (tukša kamera bez logiem un šķidruma) krītot uz fotoelementu, un tiek salīdzināta ar gaismu, kas krīt uz fotoelementu izejot cauri nodaļumam, kurā ir kamera ar radzeni. Tiek salīdzināta abu fotoelementu uztvertās gaismas caurlaidības vērtību starpība, un uz ciparu displeja tiek izvadīta duļķošanās skaitliskā vērtība.

Pozitīvā kontrole: atkārtojums, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti, un kuram veikta apstrāde ar vielu, par ko ir zināms, ka tā izraisa attiecīgo atbildes reakciju. Lai nodrošinātu iespēju novērtēt pozitīvās kontroles atbildes reakcijas mainību laikā, nopietnu kairinājumu izraisošās reakcijas intensitāte nedrīkst būt pārlieku liela.

Ticamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var izpildīt testēšanas metodi atkārtoti. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: ar testējamo vielu neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto testējamās vielas un citos kontroles paraugos, lai noteiktu attiecīgā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdināto ar testējamo vielu apstrādāto paraugu sākotnējo atbildes reakciju. Testējot kopā ar paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī, vai šķīdinātājam vai nesējam ir mīļiedarbība ar testēšanas sistēmu.

Daudzpakāpju testēšana: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo vielu, katrā pakāpē izmantojot datu svarīguma pieeju, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās vielas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildus testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās vielas kairinājuma izraisīšanas potenciālu nevar noteikt, veic pakāpenisku secīgu testēšanas procedūru ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kurai ir veikti validācijas pētījumi, lai noteiktu metodes piemērotību noteiktam nolūkam (tostarp pareizību) un ticamību. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam.

Pierādījumu vērtēšana: process, kurā tiek apsvērtas dažādu datu priekšrocības un trūkumi, lai pieņemtu un pamatotu secinājumu par vielas potenciālo bīstamību.

2. papildinājums

BCOP testēšanas metodes standartvielas

Pirms šai testēšanas metodikai atbilstīgas testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijas var uzskatāmi apliecināt savu tehnisko prasmi, pareizi nosakot klasifikāciju 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām, kas izraisa nopietnus acu bojājumus. Šīs vielas ir izraudzītas, lai raksturotu nopietnus acu bojājumus/ nopietnu acu kairinājumu izraisītāju vielu lokālas iedarbības diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* truša acu testa rezultāti (TG 405) (t.i., 1., 2.A, 2.B kategorija, vai netiek klasificēta un marķēta saskaņā ar ANO GHS (3) (7). Taču, ņemot vērā šo testu validēto noderīgumu (t.i., nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāju vielu identificēšanai), lai pierādītu prasmi, var iegūt tikai divus klasificējamus testa rezultātus (izraisa nopietnus acu bojājumus/ nopietnu acu kairinājumu vai neizraisa nopietnus acu bojājumus/ nopietnu acu kairinājumu). Citi izvēles kritēriji ir vielu pieejamība tirgū, lai būtu pieejami ļoti kvalitatīvi *in vivo* atsaucē dati un lai būtu pieejami ļoti kvalitatīvi dati par divām *in vitro* metodēm, kurām tiek izstrādāti testēšanas norādījumi. Šī iemesla dēļ tika izraudzītas nopietnus acu bojājumus izraisošās vielas no ICCVAM ieteiktā 122 standartvielu saraksta *in vitro* acīm toksisko īpašību noteikšanas testa metožu validēšanai (sk. H papildinājumu. ICCVAM ieteiktās atsaucē vielas) (5). Atsaucē dati ir pieejami ICCVAM papildinformācijas pārskata dokumentos par BCOP metodi un izolētas vistas acs (ICE) testēšanas metodi (17) (18).

1. tabula.

Ieteicamās vielas tehniskās prasmes apliecināšanai testēšanai pēc BCOP

Vielā	CAS Nr.	Ķīmiskā klase ⁽¹⁾	Agregātstāvoklis	In vivo klasifikācija ⁽²⁾	In vitro klasifikācija ⁽³⁾
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onija savienojums	Šķidrums	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Hlorheksidīns	55-56-1	Amīns, amīdīns	Cietviela	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Dibenzoil-L-vīnskābe	2743-38-6	Karbonskābes esteris	Cietviela	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Imidazols	288-32-4	Heterocikliskais savienojums	Cietviela	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Trihloretiķskābe (30 %)	76-03-9	Karbonskābe	Šķidrums	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
2,6-Dihlorbenzoil hlorīds	4659-45-4	Acilhalogenīds	Šķidrums	2.A kategorija	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Etil-2-metilacetoacetāts	609-14-3	Ketonesteris	Šķidrums	2.B kategorija	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganiskais sāls	Cietviela	2.A kategorija	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Glicerīns	56-81-5	Spirts	Šķidrums	Netiek marķēta	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
n-heksāns	110-54-3	Ogļūdeņradis (acikliskais)	Šķidrums	Netiek marķēta	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu

Saīsinājumi: CAS Nr. = Ķīmijas analītisko apskatu indeksa reģistra numurs

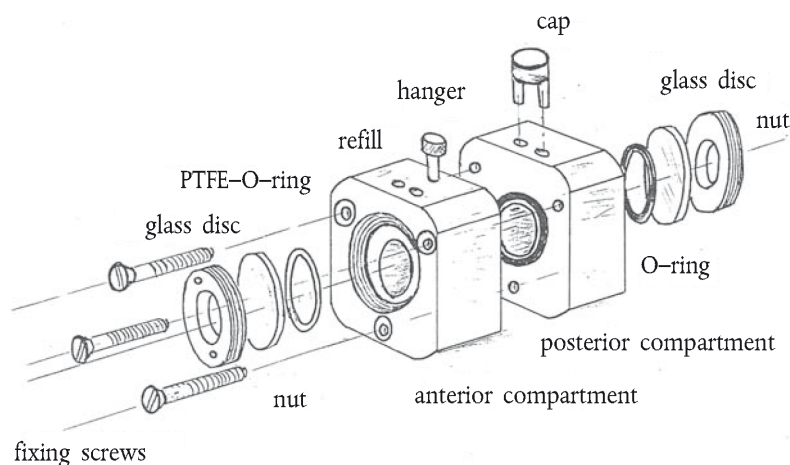
⁽¹⁾ Ķīmiskās klases katrai testējamai vielai piešķirtas, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir *National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)* klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Pamatojoties uz in vivo truša acu testa rezultātiem (ESAO TG 405) un izmantojot ANO GHS sistēmu (3)(7).⁽³⁾ Pamatojoties uz BCOP un ICE testēšanas metožu rezultātiem.

3. papildinājums

BCOP RADZENES TURĒTĀJS

1. BCOP radzeņu turētāji ir izgatavoti no inerta materiāla (piemēram, polipropilēna). Turētājs sastāv no divām pusēm (priekšējā un aizmugurējā kamera), un tam ir divas līdzīgas cilindriskas iekšējās kameras. Katras kameras tilpums ir 5 mL, un tās galā ir stikla disks, caur kuru reģistrē duļķošanās mērījumus. Katras iekšējās kameras diametrs ir 1,7 cm, un augstums 2,2 cm ⁽¹⁾. Lai nepieļautu noplūdes, aizmugurējā kamerā ievieto blīvi. Radzenes novieto ar endotēlija virsmu uz leju pret aizmugurējās kameras blīvi, un priekšējā kameru novieto uz radzenes epitēlija virsmas. Kameras notur vietā trīs nerūsējošas skrūves kameras ārējā malā. Lai nodrošinātu vieglu piekļuvi radzenei, katras kameras galā ir noņemams stikla disks. Arī starp stikla disku un kameru ir blīve, lai nepieļautu noplūdes. Barotnes un testējamās vielas ievadīšanai un izvadišanai ir paredzētas divas atveres katras kameras augšpusē. Iedarbības un inkubācijas perioda laikā tās noslēdz ar gumijas vāciņiem.

⁽¹⁾ Norādītie izmēri attiecas uz radzenes turētāju, kas paredzēts 12 līdz 60 mēnešus vecu govju acīm. Ja izmanto 6 līdz 12 mēnešus vecu dzīvnieku acis, abu turētāja kameru tilpumam jābūt 4 mL, bet abu iekšējo kameru diametram 1,5 cm un augstumam 2,2 cm. Katra jaunas konstrukcijas radzenes turētāja gadījumā ir ļoti svarīgi, lai iedarbībai pakļautā radzenes virsmas laukuma attiecība pret aizmugurējās kameras tilpumu būtu tāda pati kā standarta radzenes turētājam. Šī prasība ir vajadzīga, lai pareizi noteiktu caurlaidības vērtības IVIS aprēķināšanai saskaņā ar norādīto formulu.



Paskaidrojumi

Glass disc: Stikla disks

PTFE-O-ring: PTFE blīve

Refill: Iepildīšana

Hanger: Piestiprinājums

Cap: Vāciņš

Nut: Uzgrieznis

O-ring: Blīve

Posterior compartment: Aizmugurējā kamera

Anterior compartment: Priekšējā kamera

Fixing screws: Savienošanas skrūves

OPACITOMETERS

- Opacitometrs ir gaismas caurlaidības mērierīce. Halogēnlampas gaisma iet cauri kontroles nodalījumam (tukša kamera bez logiem un šķidrums) krītot uz fotoelementu, un tiek salīdzināta ar gaismu, kas krīt uz fotoelementu izejot cauri nodalījumam, kurā ir kamera ar radzeni. Tiek salīdzināta fotoelementu uztvertā gaismas starojuma starpība, un uz ciparu displeja tiek izvadīta duļķošanās skaitliskā vērtība.
- Opacimetra rādījumiem visā mērījumu diapazonā jābūt lineārai sakarībai līdz pat prognozes modelī aprakstīto dažādo klasifikāciju robežvērtībām (t.i., līdz robežvērtībai, kas atbilst nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu izraisītāju vielu klasifikācijai). Lai nodrošinātu lineārus un precīzus rādījumus līdz 75-80 duļķošanās vienībām, opacitometrs ir jākalibrē ar vairākiem kalibratoriem. Kalibratorus (puscaurspīdīgas poliestera loksnes) novieto kalibrēšanas kamerā (radzenes kamera, kas paredzēta kalibrēšanas līdzekļu turēšanai) un nolasa opacimetra rādījumu. Kalibrēšanas kamera ir izveidota tā, lai kalibrators atrastos apmēram tādā pašā attālumā no gaismas un fotoelementa, kādā duļķošanās mērījumu laikā būtu novietota radzene. Opacimetru vispirms iestata uz 0 duļķošanās vienībām bez kalibratora kalibrēšanas kamerā. Pēc tam pārmaiņus pa vienam kalibrēšanas kamerā ievieto trīs dažādus kalibrаторus un mēra duļķošanos. Duļķošanās rādījumiem 1., 2. un 3. kalibratoram jābūt attiecīgi 75, 150 un 225 duļķošanās vienības $\pm 5\%$.

B.48 IZOLĒTAS VISTAS ACS TESTĒŠANAS METODE NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS VAI NOPIETNU KAIRINĀJUMU IZRAISĪTĀJU VIELU IDENTIFICĒŠANAI**IEVADS**

1. Izolētas vistas acs (ICE) testēšanas metode *in vitro* ir noteikšanas metode, ko konkrētos apstākļos un ar noteiktiem ierobežojumiem var izmantot, lai vielas un to maisījumus klasificētu kā "nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu" izraisītājus (1) (2) (3). Šajā testēšanas metodē par nopietnu kairinājumu izraisošām uzskata vielas, kas trušiem rada acu bojājumus, kuri neizzūd vismaz 21 dienas laikā pēc iedarbības. Kaut gan netiek uzskatīts, ka ar ICE var pilnībā aizstāt iedarbības testu uz acīm *in vivo* ar trušiem, ICE iesaka izmantot daudzpakāpju testēšanas stratēģijā, lai īpašas lietošanas jomā veiktu normatīvajos aktos reglamentēto klasifikāciju un marķēšanu (4) (5). Testējamās vielas (6) var klasificēt kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisošas, neveicot papildu testēšanu ar trušiem. Ar vielām, kuru testēšanas rezultāts ir negatīvs, jāveic izmēģinājumi, izmantojot trušus, pēc pakāpeniskas loģiski secīgas testēšanas stratēģiju saskaņā ar ESAO testēšanas norādījumiem OECD Test Guideline 405 (7) (ši pielikuma B. 5. nodaļa).
2. Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai vērtētu testējamās vielas potenciālo nopietnus bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīto iedarbību uz acīm, ko mēra ar tās spēju izraisīt toksisku iedarbību uz izolētu vistas aci. Toksisko iedarbību uz radzeni mēra ar šādiem parametriem: (i) kvalitatīvs duļķošanās novērtējums, (ii) kvalitatīvs epitēlija bojājumu novērtējums, pamatojoties uz fluoresceīna aplicēšanu acij (fluoresceīna aizturēšana), (iii) kvantitatīvs biezuma palielināšanās (uzbrieduma) novērtējums un (iv) kvalitatīvs makroskopisko morfoloģisko virsmi radīto bojājumu novērtējums. Radzenes duļķošanās, uzbrieduma un bojājumu novērtējumu pēc testējamās vielas iedarbības novērtē atsevišķi un pēc tam apvieno, lai noteiktu acu kairinājuma klasifikāciju.
3. Izmantojot ICE testēšanas metodi, ir testētas arī acu kairinājumu izraisošas vielas, kas rada bojājumus, kuri izzūd drīzāk nekā 21 dienā, un vielas, kam nav kairinājumu izraisošas iedarbības. Taču ICE testēšanas metodes pareizība un ticamība šo kategoriju vielām nav formāli novērtēta.
4. Definīcijas sk. 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

5. Šīs testēšanas metodes pamatā ir Alternatīvo metožu validēšanas starpagentūru koordinācijas komitejas (ICCVAM) ICE testēšanas metodes protokols (8), kas tika izstrādāts pēc starptautiska validācijas pētījuma (4) (5) (9), kurā piedalījās Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs, Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centrs un TNO Dzīves kvalitātes nodaļas toksikoloģijas un praktiskās farmakoloģijas departaments (Nīderlande). Protokola pamatā ir informācija, kas iegūta no publicētiem protokoliem, kā arī TNO pašlaik izmantotā protokola (10) (11) (12) (13) (14).
6. Šīs metodes apzinātie ierobežojumi ir liels kļūdains pozitīvo rezultātu procents spirtiem un liels kļūdains negatīvo rezultātu procents cietvielām un virsmaktīvām vielām (sk. 47. punktu) (4). Ja no datubāzes izslēdz vielas, kas ietilpst šajās ķīmisko un fizikālo īpašību klasēs, ICE precizitāte ES, EPA un GHS klasifikācijas sistēmās ievērojami uzlabojas (4). Pamatojoties uz šīs testēšanas mērķi (t.i., identificēt tikai nopietnus acu bojājumus / nopietnu kairinājumu izraisošas vielas), kļūdains negatīvo rezultātu procentam nav būtiskas nozīmes, jo šādas vielas pēc tam tiktu testētas izmēģinājumos ar trušiem vai citus pietiekami validētus *in vitro* testus, atkarībā no normatīvo aktu prasībām, izmantojot secīgas testēšanas stratēģiju un datu nozīmīguma pieeju. Turklāt, izmantojot līdzšinējo validācijas datubāzi, nevarēja pienācīgi novērtēt dažas ķīmisko vielu vai produktu klases (piemēram, maisījumus). Taču var apsvērt iespējas izmantot šo testēšanas metodi visu veidu testējamajiem materiāliem (tostarp maisījumiem), ja pozitīvs rezultāts var būt pieņemams kā norāde par nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīto iedarbību. Taču spirtu testēšanā iegūti pozitīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi pārvērtēšanas riska dēļ.
7. Visās procedūrās ar vistu acīm testēšanas iestādēm jāievēro piemērojamie noteikumi un procedūras darbībām ar cilvēku vai dzīvnieku izcelsmes materiāliem, pie kuriem pieder arī audi un audu šķidrumi. Bez tam ieteicams ievērot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā (15).
8. Testēšanas metodē netiek ņemti vērā konjunktīvas un varavīksnienes bojājumi, kas ir tās ierobežojums, tomēr tajā tiek ņemti vērā daži iedarbības veidi uz aci, kas tiek novērtēti truša acs kairinājuma testa metodē, un zināmā mērā to smagums. Kaut gan radzenes bojājumu atgriezeniskumu nevar novērtēt, izmantojot ICE testēšanas metodi, pamatojoties uz trušu acu pētījumiem, ir ierosināts, ka, lai nošķirtu neatgriezenisku un atgriezenisku iedarbību, var izmantot radzenes bojājuma sākotnējā dziļuma novērtējumu (16). Visbeidzot, izmantojot ICE testēšanas metodi, nevar novērtēt sistēmiskas toksicitātes potenciālu saistībā ar iedarbību uz acīm.
9. Patlaban notiek darbs pie precīzāku raksturlielumu izstrādes ICE testēšanas metodes nodrošināšanai un ierobežojumiem tādu vielu identificēšanai, kas nerada nopietnus acu bojājumus vai nopietnu acu kairinājumu (sk. arī 48. punktu). Lietotāji tiek aicināti iesniegt validācijas organizācijām paraugus un/vai datus, lai tās formāli novērtētu ICE testēšanas metodes turpmākos lietošanas veidus, tostarp nopietna acu kairinājuma izraisīto un acu kairinājumu neizraisīto vielu identificēšanai.

10. Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 2. papildinājumā norādītās standartvielas. Laboratorija šīs vielas var izmantot ICE testēšanas metodes izpildes tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms ICE testēšanas rezultātu datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

METODES PRINCIPS

11. ICE testēšanas metode ir orgāntipisks modelis, kas īslaicīgi nodrošina iespēju saglabāt vistas aci *in vitro*. Šajā testēšanas metodē testējamās vielas radītos bojājumus novērtē, nosakot radzenes uzbriedumu, duļķošanos un fluoresceīna aizturi. Divi pēdējie parametri tiek novērtēti kvalitatīvi, bet radzenes uzbrieduma noteikšana ir kvantitatīva. Katru novērtējumu pārvērš kvantitatīvā rezultātā, ko izmanto, lai aprēķinātu kopējo kairinājuma rādītāju, vai tam piešķir kvalitatīvu kategoriju, ko izmanto, lai *in vitro* noteiktu nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāju iedarbības klasifikāciju. Abus rezultātus var izmantot, lai prognozētu testējamās vielas potenciālo *in vivo* nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāju iedarbību (sk. sadaļu "Lēmuma pieņemšanas kritēriji").

Vistu acu iegūšanai izmantojamo dzīvnieku avots un vecums

12. Parasti šajā testā izmanto acis, kas ņemtas no kautuvē cilvēku patēriņam pārtikai kautām vistām, tāpēc laboratorijas dzīvnieki nav jāizmanto. Izmanto tikai veselīgu dzīvnieku acis, kurus uzskata par piemērotiem cilvēkiem paredzētas pārtikas aprītei.
13. Kaut gan vistu optimālā vecuma novērtēšanai nav veikts īpašs pētījums, šajā testēšanas metodē ierasti izmanto pavasara cāļus, kurus parasti apstrādā putnu kautuvē (t.i., aptuveni 7 nedēļas vecus, 1,5–2,5 kg).

Acu ņemšana un nogādāšana laboratorijā

14. Galvas atdala tūlīt pēc vistu apdullināšanas, parasti ar elektriskās strāvas triecienu, un asiņu nolaišanas pa griezumam kaklā. Jāizvēlas vietējs vistu sagādes avots, kas atrodas iespējami tuvu laboratorijai, lai vistu galvas no kautuves varētu nogādāt laboratorijā, iespējami samazinot to bojāšanos un/vai bakteriālo kontamināciju. Laiks no vistu galvu ņemšanas līdz acu izmantošanai ICE testam ir iespējami jāsamazina (parasti divu stundu laikā), un uzskatāmi jāparāda, ka tam nav nevēlamas ietekmes uz noteikšanas rezultātiem. Šo rezultātu pamatā ir acu izvēles kritēriji, kā arī pozitīvās un negatīvās kontroles reakcijas. Visām testēšanai izmantotajām acīm ir jābūt no vienas noteiktā dienā ņemtu acu grupas.
15. Tā kā acis laboratorijā tiek preparētas, galvas no kautuves transportē pie apkārtējās vides temperatūras plastmasas kārbās, kurās mitrumu uztur ar sāls izotoniskā šķīdumā samitrinātiem dvieļiem.

ICE testam izmantojamo acu izvēles kritēriji

16. Izbrāķē acis, kurām pēc izņemšanas ir augsts fluoresceīna sākotnējais saistīšanas rādītājs (t.i., $> 0,5$) vai radzenes duļķošanās rādītājs (t.i., $> 0,5$).
17. Katrā paraugu grupā un paralēlajā pozitīvajā kontrolē testē vismaz trīs acis. Negatīvās kontroles grupā vai šķīdinātāja kontrolē (ja izmanto šķīdinātāju, izņemot sāls šķīdumu) ir jābūt vismaz vienai acij.

PROCEDŪRA

Acu sagatavošana

18. Uzmanīgi noņem plakstiņus, nebojājot radzeni. Radzenes integritāti ātri novērtē, uz dažām sekundēm uzpilinot tās virsmai 2 % (masas) fluoresceīna nātrija sāls šķīdumu, ko pēc tam noskalo ar sāls izotonisko šķīdumu. Pēc tam ar fluoresceīnu apstrādātas acis pārbauda ar spraugas lampas mikroskopu, lai pārliecinātos, vai radzene nav bojāta (t.i., ja fluoresceīna aiztures un radzenes duļķošanās rādītāji ir $\leq 0,5$).
19. Ja acs nav bojāta, to uzmanīgi, nebojājot radzeni, izpreparē galvaskausa. Acs ābolu izvelk no dobuma, stingri pieturot mirkšķināšanas membrānu ar ķirurģiskajām knaiblēm, un acs muskuļus pārgriež ar liektām šķērēm ar noapaļotiem galiem. Svarīgi ir nepieļaut radzenes bojājumus pārmērīga spiediena dēļ (t.i., saspiešanas artefakti).
20. Kad acs ir izņemta no dobuma, pie tās atstāj redzamu daļu redzes nerva. Pēc izņemšanas no dobuma aci novieto uz absorbējoša paliktņa un nogriež mirkšķināšanas membrānu un citus saistaudus.

21. Izņemto aci ar radzeni vertikālā stāvoklī iestiprina nerūsējošā tērauda skavā. Skavu pēc tam ievieto mitrināšanas aparāta kamerā (16). Skavas mitrināšanas aparātā ievieto tā, lai izotoniskā sāls šķiduma pilieni mitrinātu visu radzeni. Mitrināšanas aparāta kamerā jāuztur $32 \pm 1,5$ °C temperatūra. Tipisku mitrināšanas aparāta (ko var iegādāties vai izgatavot) un acu stiprinājuma skavu shēmu sk. 3. papildinājumā. Aparātu var pārveidot atbilstoši konkrētās laboratorijas vajadzībām (piemēram, lai izmantotu atšķirīgu acu skaitu).
22. Pēc ievietošanas mitrināšanas aparātā acis vēlreiz apskata ar spraugas lampas mikroskopu, lai pārliecinātos, ka preparēšanas procedūrā tās nav bojātas. Izmēra radzenes biezumu radzenes virsotnē, izmantojot spraugas lampas mikroskopa dziļuma mērīšanas ierīci. Nomaina visas acis, (i) kuru fluoresceīna aiztures rezultāts ir $> 0,5$, (ii) kuru radzenes duļķošanās rādītājs ir $> 0,5$ vai (iii) kam ir jebkuras citas bojājumu pazīmes. No tām acīm, kas netiek izbrāķētas neviena šī kritērija dēļ, izbrāķē tās, kuru radzenes biezums atšķiras no visu acu radzenes vidējā biezuma rādītāja par vairāk nekā 10 %. Lietotājiem jāņem vērā, ka, izmantojot spraugas lampas mikroskopu, ar dažādu spraugas platumu radzenes biezuma mērījumu rezultāti var būt atšķirīgi. Spraugas platums jāiestata 0,095 mm.
23. Kad visas acis ir pārbaudītas un atzītas par derīgām, acis apmēram 45 līdz 60 min inkubē, lai pirms aplicēšanas tās līdzsvarotu ar testēšanas sistēmu. Pēc līdzsvarošanas reģistrē radzenes biezuma un duļķošanās nulles sākotnējos mērījumus, ko izmanto kā sākuma punktu (t.i., laiks = 0). Šim testēšanas beigu punktam kā sākotnējās atskaites punktu izmanto fluoresceīna aiztures rādītāju, kas noteikts acs preparēšanas laikā.

Testējamās vielas aplicēšana

24. Tūlīt pēc nulles sākotnējiem mērījumiem (turētājā ievietotu) aci izņem no mitrināšanas aparāta, novieto horizontāli un uz radzenes aplicē testējamo vielu.
25. Testējamās vielas, kas ir šķidrumi, parasti testē neatšķaidītas, taču tās var atšķaidīt, ja tas tiek uzskatīts par vajadzīgu (piemēram, plānojot pētījumu). Atšķaidīšanai ieteicams izmantot sāls fizioloģisko šķidrumu. Kontrolētos apstākļos var izmantot arī citus šķīdinātājus, taču, izņemot sāls fizioloģisko šķidrumu, citu šķīdinātāju piemērotība ir uzskatāmi jāparāda.
26. Testējamās vielas, kas ir šķidrumi, uz radzenes aplicē tā, lai pilnībā visa radzenes virsma tiktu vienmērīgi noklāta ar testējamo vielu; standarta tilpums ir 0,03 mL.
27. Cietvielas iespējami sīki jāsmalcina pietā, vai izmantojot līdzvērtīgu smalcināšanas ierīci. Pulveri aplicē uz radzenes tā, lai virsmu vienmērīgi pārklātu ar testējamo vielu; standarta daudzums ir 0,03 g.
28. Testējamo vielu (šķidruma vai cietvielas veidā) aplicē uz 10 sek un pēc tam noskalo no acs ar istabas temperatūras sāls izotonisko šķidrumu (apmēram 20 mL). Pēc tam aci (ievietotu turētājā) atkal ievieto mitrināšanas aparātā sākotnējā vertikālajā stāvoklī.

Kontroles vielas

29. Katrā eksperimentā iekļauj paralēlas negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles un pozitīvās kontroles.
30. Testējot šķidrumus 100 % koncentrācijā vai cietvielas, ICE testēšanas metodē izmanto paralēlu negatīvo kontroli ar sāls fizioloģisko šķidrumu, lai konstatētu neraksturīgas testēšanas sistēmas izmaiņas un nodrošinātu, ka noteikšanas apstākļu dēļ netiek konstatēta kairinājumu izraisīša reakcija.
31. Testējot atšķaidītus šķidrumus, testēšanas metodē iekļauj paralēlu šķīdinātāja/nesēja kontroles grupu, lai konstatētu neraksturīgas testēšanas sistēmas izmaiņas un nodrošinātu, ka testēšanas apstākļu dēļ kairinājumu izraisīša reakcija netiek konstatēta. Kā noteikts 25. punktā, drīkst izmantot tikai tādu šķīdinātāju/nesēju, par kuru ir liecības, ka tam nav nelabvēlīgas ietekmes uz testēšanas sistēmu.

32. Katrā eksperimentā kā paralēlu pozitīvo kontroli iekļauj testu ar zināmu acu kairinājumu izraisošu vielu, lai pārliecinātos, ka izraisītā atbildes reakcija ir atbilstoša. Tā kā šajā testēšanas metodē ICE tests tiek izmantots nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāju vielu identificēšanai, pozitīvās kontroles vielai jābūt standartvielai, kas šajā testēšanas metodē izraisa spēcīgu reakciju. Tomēr, lai nodrošinātu iespēju novērtēt pozitīvās kontroles reakcijas mainību laikā, spēcīgās reakcijas intensitāte nedrīkst būt pārmērīgi liela. Pozitīvās kontroles vajadzībām jāiegūst pietiekami daudz *in vitro* datu, lai varētu aprēķināt statistiski noteiktu pozitīvajai kontrolei pieņemamo vērtību intervālu. Ja pozitīvajai kontrolei nav pieejams pietiekams daudzums iepriekš iegūtu vēsturisko ICE testēšanas metodes datu, iespējams, jāveic pētījumi, lai šo informāciju iegūtu.
33. Pozitīvās kontroles piemēri testējamajām vielām, kas ir šķidrums, ir 10 % etiķskābe vai 5 % benzalkonija hlorīds, bet pozitīvās kontroles testējamām cietvielām ir nātrija hidroksīds vai imidazols.
34. Salīdzināšanas vielas ir lietderīgi izmantot, lai novērtētu nezināmu noteiktas ķīmisko vielu vai produktu kategorijas spēju izraisīt acu kairinājumu, vai arī, lai novērtētu acu kairinājumu izraisošas vielas salīdzinošo spēju izraisīt noteiktas intensitātes atbildes reakciju uz kairinājumu.

Mērāmie beigu punkti

35. Apstrādātās radzenes novērtē pirms aplicēšanas un 30, 75, 120, 180 un 240 min (± 5 min) pēc skalošanas apstrādes beigās. Ar šiem laika intervāliem pietiek, lai četru stundu ilgajā iedarbības periodā veiktu pietiekamu skaitu mērījumu un starp mērījumiem būtu pietiekami ilgs laiks visu vajadzīgo novērojumu veikšanai.
36. Novērtē šādus parametrus: radzenes duļķošanās, uzbriedums, fluoresceīna aizture un morfoloģiskās izmaiņas (piemēram, epitēlija izdrupšana vai atslābšana). Visus parametrus, izņemot fluoresceīna aizturi (ko nosaka tikai pirms aplicēšanas un 30 min pēc testējamās vielas iedarbības), nosaka katrā no iepriekš minētajiem laika intervāliem.
37. Radzenes duļķošanās, fluoresceīna aiztures, morfoloģisko izmaiņu un histopatoloģisko izmaiņu, ja tās tiek noteiktas, dokumentēšanai ieteicams izmantot fotogrāfijas.
38. Pēc pēdējās noteikšanas četru stundu perioda beigās lietotājiem ieteicams saglabāt acis piemērotā fiksativā (piemēram, neitrālā buferētā formalinā) iespējamai histopatoloģiskai izmeklēšanai.
39. Radzenes uzbriedumu nosaka no radzenes biezuma mērījumiem ar spraugas lampas mikroskopa optisko pahimetru. To izsaka procentos un aprēķina saskaņā ar radzeņu biezuma mērījumiem saskaņā ar šādu formulu:

$$\left(\frac{\text{radzenes biezums laikā } t - \text{sākotnējais radzenes biezums} = 0}{\text{sākotnējais radzenes biezums} = 0} \right) \times 100$$

40. Visiem novērojumu laika intervāliem aprēķina visu testējamo acu radzeņu vidējo uzbriedumu procentos. Pamatojoties uz augstāko radzeņu uzbrieduma vidējo rādītāju, kas novērots jebkurā laika intervālā, katrai testējamai vielai piešķir kopējo kategorijas rezultātu.
41. Radzenes duļķošanos aprēķina pēc tās radzenes daļas, kurai noteikts skaitliski lielākais duļķošanās rādītājs. Visām testējamajām acīm visos novērojumu laika intervālos aprēķina radzeņu duļķošanās vidējo rādītāju. Pamatojoties uz jebkurā laika intervālā novērotās radzeņu duļķošanās augstāko vidējo rādītāju, katrai testējamai vielai piešķir kopējo kategorijas rezultātu (1. tabula).

1. tabula

Radzenes duļķošanās rādītājs

Rādītājs	Novērojums
0	Nav duļķošanās
0,5	Ļoti vāja duļķošanās

Rādītājs	Novērojums
1	Izkaisītas vai difūzas zonas, labi redzamas varavīksnenes daļas
2	Labi izšķirama caurspīdīgā daļa, varavīksnenes daļas redzamas nedaudz neskaidri
3	Liela radzenes duļķošanās, atsevišķas varavīksnenes daļas nav redzamas, acs zīlītes izmērs tikko saskatāms
4	Pilnīga radzenes duļķošanās, varavīksnene nav saskatāma

42. Vidējo fluoresceīna aiztures vērtību visām testējamām acīm aprēķina tikai 30 min novērošanas intervālam un izmanto, lai piešķirtu katrai testējamai vielai kopējo kategorijas rezultātu (2. tabula).

2. tabula

Fluoresceīna aiztures rādītājs

Rezultāts	Novērojums
0	Nav fluoresceīna aiztures
0,5	Ļoti neliela atsevišķu šūnu iekrāsošanās
1	Neregulāra atsevišķu šūnu iekrāsošanās visā apstrādātajā radzenes daļā
2	Koncentrēta vai saplūstoša blīva atsevišķu šūnu iekrāsošanās
3	Lielas, saplūstošas radzenes daļas iekrāsošanās ar fluoresceīnu

43. Morfoloģisko izmaiņu veidi ir radzenes epitēlija šūnu "izdrupšana", epitēlija "atslābšana", "nelīdzenumu veidošanās" radzenes virsmā un testējamās vielas "pielipšana" pie radzenes. Šo bojājumu smaguma pakāpe var atšķirties, un vairākas šīs pazīmes var konstatēt vienlaicīgi. Atkarībā no testēšanas veicēja interpretācijas šo bojājumu klasifikācija ir subjektīva.

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Datu novērtēšana

44. Radzenes duļķošanās, uzbrieduma un fluoresceīna aiztures rezultāti jānovērtē atsevišķi, lai katram beigu punktam iegūtu ICE klasi. Pēc tam attiecīgās testējamās vielas izraisītā kairinājuma klasifikācijas iegūšanai apvieno visiem beigu punktiem noteiktās ICE klases.

Lēmuma pieņemšanas kritēriji

45. Pēc visu beigu punktu novērtēšanas var piešķirt ICE klases, pamatojoties uz iepriekš noteiktiem rādītāju vērtību intervāliem. Radzenes biezumu (3. tabula), duļķošanos (4. tabula) un fluoresceīna aizturi (5. tabula) atbilstoši četrām ICE klasēm interpretē šādi.

3. tabula

ICE radzenes biezuma klasifikācijas kritēriji

Vidējais radzenes uzbriedums (%) (*)	ICE klase
0 līdz 5	I
> 5 līdz 12	II
> 12 līdz 18 (> 75 min pēc aplicēšanas)	II
> 12 līdz 18 (≤ 75 min pēc aplicēšanas)	III
> 18 līdz 26	III

Vidējais radzenes uzbriedums (%) (*)	ICE klase
> 26 līdz 32 (> 75 min pēc aplicēšanas)	III
> 26 līdz 32 (≤ 75 min pēc aplicēšanas)	IV
> 32	IV

(*) Radzenes uzbrieduma rādītājus izmanto tikai tad, ja biezums ir mērīts ar *Haag-Streit BP900* spraugas lampas mikroskopu, izmantojot dziļuma mērīšanas ierīci Nr. I un spraugas platuma iestatījuma vērtību 9½, kas vienāda ar 0,095 mm. Lietotājiem jāņem vērā, ka, izmantojot spraugas lampas mikroskopu, ar dažādu spraugas platumu var iegūt atšķirīgus radzenes biezuma mērījumu rezultātus.

4. tabula

ICE klasifikācijas kritēriji duļķošanās novērtēšanai

Lielākais vidējais duļķošanās rādītājs (*)	ICE klase
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Skatīt 1. tabulu.

5. tabula

ICE klasifikācijas kritēriji fluoresceīna aiztures vidējā rādītāja novērtēšanai

Fluoresceīna aiztures vidējais rādītājs 30 min pēc aplicēšanas (*)	ICE klase
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Sk. 2. tabulu.

46. Kopējo testējamās vielas *in vitro* kairinājuma klasifikācijas kategoriju nosaka atbilstīgi kairinājuma klasifikācijai, kas atbilst radzenes uzbrieduma, radzenes duļķošanās un fluoresceīna aiztures rādītāju kombinācijai, izmantojot 6. tabulā noteikto shēmu.

6. tabula

Kopējās *in vitro* kairinājuma klasifikācijas

Klasifikācija	3 parametru rādītāju kombinācija
Izraisa nopietnus acu bojājumus/ nopietnu acu kairinājumu	$3 \times IV$ $2 \times IV, 1 \times III$ $2 \times IV, 1 \times II$ (*) $2 \times IV, 1 \times I$ (*) Radzenes duļķošanās ≥ 3 pēc 30 min (vismaz 2 acīm) Radzenes duļķošanās = 4 jebkurā laika intervālā (vismaz 2 acīm) Ievērojama epitēlija atslābšana (vismaz 1 acij)

(*) Mazāk ticama kombinācija.

47. Kā noteikts 1. punktā, gadījumos, kad testējamā viela netiek identificēta kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāja, klasifikācijas un marķēšanas nolūkā ir jāveic papildu testēšana. Nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāju vielu identificēšanas kopējā pareizība pēc ICE testēšanas metodes ir no 83 % (120/144) līdz 87 % (134/154), kļūdaini pozitīvo rezultātu daļa ir no 6 % (7/122) līdz 8 % (9/116) un kļūdaini negatīvo rezultātu daļa ir no 41 % (13/32) līdz 50 % (15/30), salīdzinot ar izmēģinājumu rezultātiem ar trušu acīm *in vivo* atbilstīgi EPA (1), ES (2) vai GHS (3) klasifikācijas sistēmai. Ja noteiktas ķīmisko (t.i., spirti un virsmaktīvās vielas) un fizikālo īpašību (t.i., cietvielas) grupas vielas izslēdz no datubāzes, ICE pareizība ES, EPA un GHS klasifikācijas sistēmā ir no 91 % (75/82) līdz 92 % (69/75), kļūdaini pozitīvo rezultātu daļa ir no 5 % (4/73) līdz 6 % (4/70) un kļūdaini negatīvo rezultātu daļa ir no 29 % (2/7) līdz 33 % (3/9) (4).

48. Ja testējamā viela netiek klasificēta kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāja, kopā ar *in vivo* truša acu testa vai cita atbilstīgi validēta *in vitro* testa datiem ICE dati var būt noderīgi, lai turpmāk novērtētu ICE testēšanas metodes piemērotību un ierobežojumus kā nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu neizraisīto vielu identificēšanai (tiek izstrādāts norādījumu dokuments par *in vitro* testēšanas metodēm, lai noteiktu toksicitāti acīm).

Testa rezultātu pieņemamības kritēriji

49. Testēšanas rezultātu uzskata par pieņemamu, ja paralēlajā negatīvajā vai nesēja/šķīdinātāja kontrolē un paralēlajā pozitīvajā kontrolē tiek noteikta kairinājuma klasifikācija, kas atbilst attiecīgi kairinājumu izraisīto un nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisīto vielu klasifikācijai.

Testēšanas pārskats

50. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija, kas attiecas uz konkrēto noteikšanu.

Testējamās vielas un kontrolvielas

Ķīmiskais nosaukums(-i), piemēram, ķīmijas analītisko apskatu indeksā (*Chemical Abstracts Service, CAS*) izmantotais nosaukums, pēc tam citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi;

CAS reģistra numurs, ja tas ir zināms;

vielas vai maisījuma tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama;

fizikāli ķīmiskās īpašības, kas attiecas uz pētījuma veikšanu, piemēram, fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, vielas ķīmiskā klase, šķīdība ūdenī;

testējamās/kontroles vielas sagatavošana testēšanai, ja tiek veikta (piemēram, sildīšana, sasmalcināšana);

stabilitāte, ja zināma.

Informācija par sponsoru un testēšanas iestādi

Sponsora, testēšanas iestādes nosaukums, pētījuma vadītāja uzvārds un adrese;

norāde par acu ņemšanas vietu (t.i., iestāde, kur tās ņemtas);

Acu glabāšanas un transportēšanas apstākļi (piemēram, acu ņemšanas datums un laiks, līdz testēšanas sākumam pagājušais laiks);

īpašas to dzīvnieku pazīmes, no kuriem ņemtas acis, ja tādas ir pieejamas (piemēram, donordzīvnieka vecums, dzimums, dzīvsvars).

Izmantotās testēšanas metodes un protokola pamatojums

Testēšanas metodes integritāte

Procedūra, ko izmanto, lai nodrošinātu testēšanas metodes integritāti (t.i., pareizību un ticamību) laikā (piemēram, periodiska standartvielu testēšana, iepriekš iegūto vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroles datu izmantošana).

Testa apstiprināšanas kritēriji

ja vajadzīgs, pieņemami paralēlo standarta kontroļu diapazoni, pamatojoties uz iepriekš iegūtajiem vēsturiskajiem datiem.

Testēšanas apstākļi

Izmantotās testēšanas sistēmas apraksts;

izmantotais spraugas lampas mikroskops (piemēram, modelis);

izmantotā spraugas lampas mikroskopa instrumentu iestatījumi;

informācija par izmantotajām vistu acīm, tostarp to kvalitātes apliecinājumi;

sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru;

izmantotā(-s) testējamās vielas koncentrācija(s),

testēšanas procedūras iespējamo modifikāciju apraksts;

atsauce uz vēsturiskajiem datiem par modeli (piemēram, negatīvās un pozitīvās kontroles, standartvielas, salīdzināšanas vielas);

izmantoto novērtējuma kritēriju apraksts.

Rezultāti

Novērojumu apraksts;

attiecīgos gadījumos acs fotogrāfijas;

*Rezultātu novērtējums**Secinājums***LITERATŪRA**

- (1) U.S. EPA (1996). *Label Review Manual: 2nd Edition*. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006. OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.
- (3) United nations (UN) (2007). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition*, UN New York and Geneva, 2007. Pieejams:

[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. Pieejams:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]

- (5) ESAC (2007). *Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants*. Pieejams:

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

- (6) Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH), un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, 93/67/EEK, 93/105/EK un 2000/21/EK. OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.
- (7) OECD (2002). *Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion*. Pieejams:
[\[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html\]](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- (8) ICCVAM (2007). *ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol*. In: *ICCVAM Test Method Evaluation Report - In vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives*. 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. Pieejams:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](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. Pieejams:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)
- (10) Prinsen, M.K. and Koeter, 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)*. Pieejams:
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](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*. Pieejams:
[\[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf\]](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*. Pieejams:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)
- (19) ICCVAM (2006). *Background review document, Current Status of In vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method*. Pieejams:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pēc testēšanas metodes iegūto mērījumu rezultātu sakritības pakāpe ar attiecīgajām references vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veikspējas raksturlielums un viens no tās piemērotības aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "sakritība" vai atbilstība, ar to domājot pareizo rezultātu daļu, ko iegūst pēc testēšanas metodes.

Salīdzināšanas viela: viela, ko izmanto kā standartu salīdzināšanai ar testējamo vielu. Salīdzināšanas vielai ir jābūt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs un uzticams ieguves avots, (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo vielu klases vielām, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem iedarbības veidiem un (v) vielas zināmais iedarbības stiprums atbilst vēlamās reakcijas intensitātes diapazonam.

Radzene: acs ābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

Radzenes dulķošanās: izmērītā radzenes dulķošanās pakāpe pēc testējamās vielas iedarbības. Radzenes dulķošanās palielināšanās norāda uz radzenes bojājumiem.

Radzenes uzbriedums: objektīvs ICE testa mērījums, kas norāda, kādā mērā radzene pēc testējamās vielas iedarbības ir uzbriedusi. To izsaka procentos un aprēķina no radzenes sākotnējā (pirms aplicēšanas) biezuma mērījuma un biezuma, kas pēc testēšanas materiāla iedarbības saskaņā ar ICE testēšanas metodi reģistrēts ar regulāriem intervāliem. Radzenes uzbrieduma pakāpe norāda uz radzenes bojājumiem.

EPA 1. kategorija: nopietns acu bojājums (acs audu neatgriezeniska noārdīšana), radzenes bojājums vai izraisīts kairinājums, kas saglabājas ilgāk par 21 dienu (1).

ES R41 kategorija: acs audu bojājums vai nopietni fiziski redzes traucējumi, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un nav pilnīgi atgriezeniski 21 dienas laikā pēc aplicēšanas (2).

Kļūdaini negatīvo rezultātu daļa: visu to pozitīvo vielu daļa ar attiecīgu iedarbību, kas, izmantojot konkrēto testēšanas metodi, nepareizi identificētas kā negatīvas vielas, kurai šādas iedarbības nav. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Kļūdaini pozitīvo rezultātu daļa: visu to visu to negatīvo vielu daļa bez attiecīgas iedarbības, kas, izmantojot konkrēto testēšanas metodi, nepareizi identificētas kā pozitīvas vielas ar šādu iedarbību. Tas ir viens no testēšanas metodes veikspējas raksturlielumiem.

Fluoresceīna aizture: subjektīvs ICE testa mērījums, kas norāda, kādā mērā radzenes epitēlija šūnas pēc testējamās vielas iedarbības aiztur fluoresceīna nātrija sāli. Fluoresceīna aiztures pakāpe norāda uz radzenes epitēlija bojājumiem.

GHS (Globāli harmonizētā ķīmisko vielu klasifikācijas un marķēšanas sistēma): sistēma, saskaņā ar kuru ķīmikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem kaitīgās iedarbības veidiem un to intensitātes uz cilvēka veselību un vidi, kā arī paredz atbilstošu saziņas elementu izmantošanu, piemēram, piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, piesardzības apzīmējumus un drošības datu lapas, kuru mērķis ir sniegt informāciju, kas nepieciešama cilvēku (tostarp darba devēju, strādājošo, transporta darbinieku, patērētāju un avārijas dienestu darbinieku) un vides aizsardzībai pret to kaitīgo iedarbību (3).

GHS 1. kategorija: acs audu bojājums vai nopietni fiziski redzes traucējumi, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas un kas nav pilnīgi atgriezeniski ilgāk par 21 dienu pēc vielas aplicēšanas (3).

Bīstamība: aģentam vai situācijai piemītoša īpašība, kas šā aģenta iedarbības rezultātā var radīt nevēlamu ietekmi uz attiecīgo organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

Negatīvā kontrole: ar testējamo vielu neapstrādāts atkārtojums, kurā ir visi pārējie testēšanas sistēmas komponenti. Šo paraugu testē kopā ar paraugiem, uz kuriem aplicēta testējamā viela, un citiem kontroles paraugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājam ir mijiedarbība ar testēšanas sistēmu.

Kairinājumu neizraisoša viela: viela, kas netiek klasificēta kā EPA I, II vai III kategorijas, ES R41 vai R36 kategorijas, vai GHS 1., 2.A vai 2.B kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1)(2)(3).

Nopietnus acu bojājumus izraisoša viela: (a) viela, kas rada acs audu neatgriezenisku bojājumu; (b) viela, kas tiek klasificēta kā GHS 1. kategorijas, EPA I kategorijas vai ES R41 kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1) (2) (3).

Acu kairinājumu izraisoša viela: (a) viela, kas pēc aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas izraisa acī atgriezeniskas izmaiņas, (b) viela, kas tiek klasificēta kā EPA II vai III kategorijas, ES R36 kategorijas vai GHS 2.A vai 2.B kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1) (2) (3).

Nopietnu acu kairinājumu izraisoša viela: (a) viela, kas pēc aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas izraisa acs audu bojājumus, kas ir neatgriezeniski ilgāk par 21 dienu pēc aplicēšanas vai kas izraisa nopietnus fiziskus redzes traucējumus; (b) viela, kas tiek klasificēta kā GHS 1. kategorijas, EPA I kategorijas vai ES R41 kategorijas acu kairinājumu izraisītāja viela (1)(2)(3).

Positīvā kontrole: atkārtojums, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti, un kuram veikta apstrāde ar vielu, par ko ir zināms, ka tā izraisa attiecīgo atbildes reakciju. Lai nodrošinātu iespēju novērtēt pozitīvās kontroles atbildes reakcijas mainību laikā, nopietnu kairinājumu izraisošās reakcijas intensitāte nedrīkst būt pārlietu liela.

Ticamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var izpildīt testēšanas metodi atkārtoti. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Spraugas lampas mikroskops: instruments, ko izmanto acs apskatīšanai binokulārā mikroskopa palielinājumā, izveidojot stereoskopisku, stāvus novietotu attēlu. ICE testēšanas metodē šo instrumentu izmanto, lai apskatītu vistas acs priekšējās struktūras, kā arī objektīvi izmērītu radzenes biezumu ar dziļuma mērīšanai paredzētu palīģierīci.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: ar testējamo vielu neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto testējamās vielas un citos kontroles paraugos, lai noteiktu attiecīgā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdināto ar testējamo vielu apstrādāto paraugu sākotnējo atbildes reakciju. Testējot kopā ar paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī, vai šķīdinātājam vai nesējam ir mijiedarbība ar testēšanas sistēmu.

Daudzpakāpju testēšana: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo vielu, katrā pakāpē izmantojot datu svarīguma pieeju, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās vielas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildus testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās vielas kairinājuma izraisīšanas potenciālu nevar noteikt, veic pakāpenisku secīgu testēšanas procedūru ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kurai ir veikti validācijas pētījumi, lai noteiktu metodes piemērotību noteiktam nolūkam (tostarp pareizību) un ticamību. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veikspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam.

Pierādījumu vērtēšana: process, kurā tiek apsvērtas dažādu datu priekšrocības un trūkumi, lai pieņemtu un pamatotu secinājumu par vielas potenciālo bīstamību.

2. papildinājums

ICE TESTĒŠANAS METODES STANDARTVIELAS

Pirms šai testēšanas metodikai atbilstīgas testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijas var uzskatāmi apliecināt savu tehnisko prasmi, pareizi nosakot klasifikāciju 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām, kas izraisa nopietnus acu bojājumus. Šīs vielas ir izraudzītas, lai raksturotu acu vietēju bojājumu/kairinājuma izraisīšanas diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* truša acu testa rezultāti (TG 405) (t. i., 1., 2.A, 2.B kategorija, vai netiek klasificēta un marķēta saskaņā ar ANO GHS (3) (7). Taču, ņemot vērā šo testu validēto noderīgumu (t. i., tikai nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu izraisītāju vielu identificēšanai), prasmes aplicināšanai var iegūt tikai divus klasificējamus testa rezultātus (nopietnus acu bojājumus vai nopietnu kairinājumu izraisītāja viela, vai acu bojājumus / acs kairinājumu neizraisoša viela). Citi izvēles kritēriji ir vielu pieejamība tirgū, lai būtu pieejami ļoti kvalitatīvi *in vivo* atsaucē dati un lai būtu pieejami ļoti kvalitatīvi dati par divām *in vitro* metodēm, kurām tiek izstrādāti testēšanas norādījumi. Šī iemesla dēļ tika izraudzītas nopietnus acu bojājumus izraisītājas vielas no ICCVAM ieteiktā 122 standartvielu saraksta *in vitro* acīm toksisko īpašību noteikšanas testa metožu validēšanai (sk. H papildinājumu. ICCVAM ieteiktās atsaucē vielas (4). Atsaucē dati ir pieejami ICCVAM papildinformācijas pārskata dokumentos par liellopu radzenes duļķošanās un caurlaidības (BCOP) un ICE testēšanas metodi (18) (19).

1. tabula

Ieteicamās vielas ICE metodes izpildes tehniskā prasmīguma pierādīšanai

Ķīmikālija	CAS Nr.	Ķīmiskā klase ⁽¹⁾	Agregātvoklis	<i>In vivo</i> klasifikācija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> klasifikācija ⁽³⁾
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onija savienojums	Šķidrums	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Hlorheksidīns	55-56-1	Amīns, amidīns	Cietviela	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Dibenzoil-L-vīnskābe	2743-38-6	Karbonskābes esteris	Cietviela	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Imidazols	288-32-4	Heterocikliskais savienojums	Cietviela	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Trihloretilēnskābe (30 %)	76-03-9	Karbonskābe	Šķidrums	1. kategorija	Izraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
2,6-Dihlorbenzoil hlorīds	4659-45-4	Acilhalogenīds	Šķidrums	2.A kategorija	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Etil-2-metilacetoacetāts	609-14-3	Ketonesteris	Šķidrums	2.B kategorija	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganiskais sāls	Cieta viela	2.A kategorija	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
Glicerīns	56-81-5	Spirts	Šķidrums	Netiek marķēta	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu
n-heksāns	110-54-3	Ogļūdeņradis (acikliskais)	Šķidrums	Netiek marķēta	Neizraisa nopietnus acu bojājumus/nopietnu acu kairinājumu

Saīsinājumi: CAS Nr. = Ķīmijas analītisko apskatu indeksa reģistra numurs

⁽¹⁾ Ķīmiskās klases katrai testējamai vielai piešķirtas, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir *National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)* klasifikācijas sistēma (pieejama <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

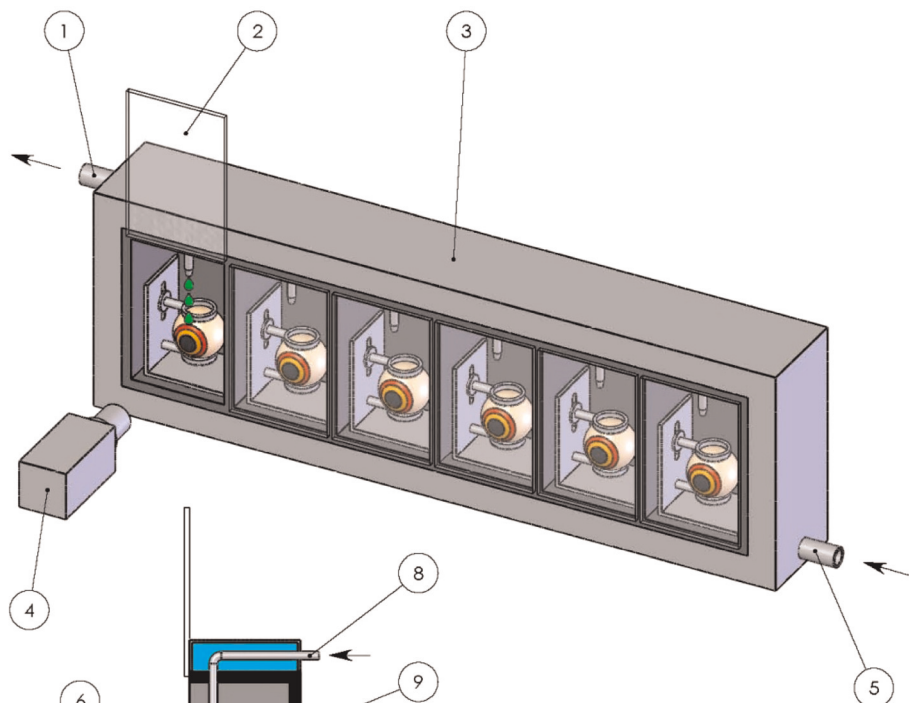
⁽²⁾ Pamatojoties uz *in vivo* truša acu testa rezultātiem (ESAO TG 405) un izmantojot ANO GHS sistēmu (3)(7).

⁽³⁾ Pamatojoties uz BCOP un ICE testēšanas metožu rezultātiem.

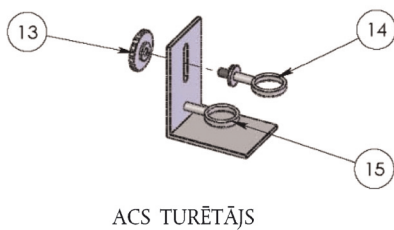
3. papildinājums

ICE mitrināšanas aparāta un acu skavu shēmas

(Mitrināšanas aparāta un acs turētāja skavas pilnīgāku aprakstu sk. Burton et al. (17))



NODALĪJUMA ŠĶĒRSGRIEZUMS



ACS TURĒTĀJS

NR.	APRAKSTS
1	SILTĀ ŪDENS NOTEKA
2	SLĪDOŠAIS VĀCIŅŠ
3	MITRINĀŠANAS APARĀTS
4	OPTISKAIS MĒRINSTRUMENTS
5	SILTĀ ŪDENS PIEVADE
6	SĀLS ŠĶĪDUMS
7	SILTS ŪDENS
8	SĀLS ŠĶĪDUMA PIEVADE
9	NODALĪJUMS
10	ACS TURĒTĀJS
11	VISTAS ACS
12	SĀLS ŠĶĪDUMA NOTEKA
13	IESTATĪŠANAS SKRŪVE
14	REGULĒJAMA AUGŠĒJĀ KĀJIŅA
15	FIKSĒTA APAKŠĒJĀ KĀJIŅA