

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (UE) Nru 1152/2010

tat-8 ta' Diċembru 2010

li jemenda, bil-ghan li jadattah għall-progress tekniku, ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

(Test b'relevanza għaž-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI EWROPEA,

Wara li kkunsidrat it-Trattat dwar il-Funzjonament tal-Unjoni Ewropea,

Wara li kkunsidrat ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tat-18 ta' Diċembru 2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jhassar ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 793/93 u r-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1488/94 kif ukoll id-Direttiva tal-Kunsill 76/769/KEE u d-Direttivi tal-Kummissjoni 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE ⁽¹⁾, u b'mod partikolari l-Artikolu 13(3) tiegħu,

Billi:

- (1) Fir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 440/2008 ⁽²⁾ jinsabu l-metodi ta' ttestjar li jintużaw biex jiġu ddeterminati l-proprietajiet fiżikokimiċi, it-tossicità u l-ekotossicità ta' sustanzi li għandhom jiġu applikati għall-finijiet tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006.
- (2) Hemm il-htieġa li r-Regolament (KE) Nru 440/2008 jiġi aġġornat biex jinkludi żewġ metodi godda ta' ttestjar in vitro għall-irritazzjoni tal-ghajnejn, li ġew adottati dan l-ahhar mill-OECD, biex jitnaqqas l-ghadd ta' annimali li

jintużaw għal għanijiet sperimentali, skont id-Direttiva tal-Kunsill Nru 86/609/KEE tal-24 ta' Novembru 1986 dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet, regolamenti u dispozizzjonijiet amministrattivi tal-Istati Membri dwar il-protezzjoni tal-annimali użati għal għanijiet sperimentali u għanijiet ohra xjentifiċi ⁽³⁾. Il-partijiet interessati ġew ikkonsultati dwar dan l-abbozz.

- (3) Ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 għandu għalhekk jiġi emendat skont dan.
- (4) Il-miżuri previsti f'dan ir-Regolament huma skont l-opinjoni tal-Kumitat stabbilit skont l-Artikolu 133 tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

Fil-Parti B tal-Anness għar-Regolament (KE) Nru 440/2008, il-Kapitoli B.47 u B.48 qed jiżdiedu kif stabbilit fl-Anness għal dan ir-Regolament.

Artikolu 2

Dan ir-Regolament għandu jidhol fis-seħh fit-tielet jum wara dak tal-pubblikazzjoni tiegħu f'Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea.

Dan ir-Regolament għandu jorbot fl-intier tiegħu u japplika direttament fl-Istati Membri kollha.

Magħmul fi Brussell, it-8 ta' Diċembru 2010.

Għall-Kummissjoni

Il-President

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1.

⁽³⁾ ĠU L 358, 18.12.1986, p. 1.

ANNEX

"B. 47 IL-METODU TA' TTESTJAR TAL-OPAĊITÀ U TAL-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA TAL-BOVINI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KORRUŻIVI U IRRITANTI SEVERI GHALL-GHAJNEJN

DAHLA

1. Il-metodu ta' ttestjar tal-Opacità u tal-Permeabilità tal-Kornea tal-Bovini (BCOP) huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuza, f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi, sabiex sustanzi u tahlitiet jiġu kklassifikati bħala 'sustanzi korrużivi u irritanti severi għall-ghajnejn' (1) (2) (3). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, irritanti severi huma ddefiniti bħala daww li jikkawżaw leżjonijiet fl-ghajnejn li jipersistu fil-fenek għal tal-anqas 21 jum wara l-amminis-trazzjoni. Filwaqt li ma jitqiesx validu bħala sostituzzjoni kompluta għat-test *in vivo* li jsir fuq ghajnejn il-fniek, il-BCOP huwa rrakkomandat biex jintuza bħala strateġija ta' ttestjar imtarraġ għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar regolatorji fi hdan dominju speċifiku ta' applikabilità (4) (5). Is-sustanzi tat-test u t-tahlitiet (6) jistgħu jiġu kklassifikati bħala sustanzi korrużivi jew irritanti severi għall-ghajnejn minghajr ma jsir aktar ittestjar fuq il-fniek. Sustanza li tagħti riżultat negattiv tkun teħtieġ li tiġi ttestjata fuq il-fniek permezz ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, kif deskritt fil-Linja Gwida għall-Ittestjar tal-OECD 405 (7) (il-kapitolu B.5 ta' dan l-Anness).
2. L-ghan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża korrużività jew irritazzjoni severa kif imkejla mill-hila tas-sustanza li tikkawża opacità jew zieda fil-permeabilità f'kornea bovina iżolata. L-effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu skont: (i) it-trażmissjoni mnaqqsa tad-dawl (opacità), u (ii) iż-zieda fil-passaġġ taż-żebugħa fluworexxina tas-sodju (permeabilità). Il-valutazzjonijiet tal-opacità u l-permeabilità tal-kornea wara esponiment għas-sustanza tat-test jiġu kkombinati għad-derivazzjoni ta' Puntegġ tal-Irritanza *In Vitro* (IVIS), li jintuza biex jiġi kklassifikat il-livell ta' kemm tikkawża irritazzjoni s-sustanza tat-test.
3. L-irritanti għall-ghajnejn li jikkawżaw leżjonijiet li jtilqu fanqas minn 21 jum u sustanzi li mhumieix irritanti ġew ittestjati wkoll bl-użu tal-metodu ta' ttestjar BCOP. Madankollu, l-akkuratezza u l-kredibilità tal-metodu ta' ttestjar BCOP għas-sustanzi f'dawn il-kategoriji ma ġewx evalwati b'mod formali.
4. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJET INIZJALI U LIMITAZZJONIJET

5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll tal-metodu ta' ttestjar BCOP tal-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interagenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM) (8), li ġie żviluppat wara studju ta' validazzjoni internazzjonali (4)(5)(9), b'kontribuzzjonijiet miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Gappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM). Il-protokoll huwa bbażat fuq tagħrif miksub mill-Istitut għax-Xjenzi *In Vitro* (IIVS) u l-Protokoll 124 INVITTOX (10), li jirrappreżentaw il-protokoll użat għall-istudju tal-prevalidazzjoni tal-assaġġ BCOP, li twettaq bejn l-1997 u l-1998 u li kien sponsorjat mill-Komunità Ewropea. Iż-żewġ protokoll huma bbażati fuq il-metodoloġija ta' assaġġ BCOP li ġiet irrappurtata għall-ewwel darba minn Gautheron *et al* (11).
6. Il-limitazzjonijiet identifikati għal dan il-metodu ta' ttestjar huma bbażati fuq ir-rati għoljin ta' pożittivi foloz għall-alkohols u l-ketoni u r-rata għolja ta' negattivi foloz għas-solidi osservata fil-baži tad-dejta tal-validazzjoni (ara l-paragrafu 44) (5). Meta s-sustanzi ta' dawn il-klassijiet kimiċi u fiżiċi jiġu esklużi mill-baži tad-dejta, l-akkuratezza tal-BCOP skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS titjieb b'mod sostanzjali (5). Abbażi tal-ghan ta' dan l-assaġġ (*i.e.*, li jidentifika biss is-sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-ghajnejn), rati ta' negattivi foloz mhumieix kritiċi minhabba li tali sustanzi sussegwentement jiġu ttestjati fuq il-fniek jew b'testijiet ohra *in vitro* vvalidati b'mod xieraq, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali b'approċċ ibbażat fuq l-importanza tal-evidenza. Barra minn hekk, il-baži tad-dejta tal-validazzjoni attwali ma tippermettix evalwazzjoni xierqa ta' whud mill-klassijiet kimiċi jew tal-prodotti (*eż.*, it-tahlitiet). Madankollu, l-investigaturi jistgħu jqisu li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' materjali tat-test (inklużi t-tahlitiet), fejn riżultat pożittiv ikun jista' jiġi aċċettat bħala indikattiv ta' reazzjoni għal sustanza korrużiva jew irritant sever għall-ghajnejn. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba bl-alkohols jew il-ketoni għandhom jiġu interpretati b'ċertu kawtela minhabba r-riskju ta' tbassir żejjed.
7. Il-proċeduri kollha li jinvolvu ghajnejn bovini u kornej bovini għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-ittestjar f'dak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali dderivati mill-annimali, li jinkludu, iżda li mhumieix limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Il-prekawzjonijiet universali tal-laboratorji huma rrakkomandati (12).
8. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar hija dik li, għalkemm il-metodu jqis uħud mill-effetti fuq l-ghajnejn evalwati fil-metodu ta' ttestjar tal-irritanza f'ghajnejn il-fenek u sa ċertu punt is-severità tagħhom, il-metodu ma jqisx feriti fil-konguntiva u fil-habba tal-ghajnejn. Barra dan, għalkemm ir-riversibilità tal-feriti fil-kornea ma tistax tiġi evalwata *per se* fl-assaġġ BCOP, ġie propost, abbażi ta' studji fuq ghajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali tal-ferita fil-kornea tista' tintuza biex issir distinzjoni bejn effetti reversibbli u daww irriversibbli (13). Fl-aħhar nett, il-BCOP ma jippermettix valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment tal-ghajnejn.

9. Qed isiru sforzi kontinwi sabiex jiġu kkaratterizzati aktar il-limitazzjonijiet tal-assaġġ BCOP kif ukoll kemm huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti mhux severi u sustanzi li mhux irritanti (ara wkoll il-paragrafu 45). L-utenti qed jiġu inkoraġġuti wkoll jipprovdu lill-organizzazzjonijiet tal-validazzjoni b'kampjuni u/jew dejta għal evalwazzjoni formali ta' użi futuri possibbli tal-metodu ta' ttestjar BCOP, inklużi daww għall-identifikazzjoni ta' irritanti mhux severi u sustanzi li mhux irritanti.
10. Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 2. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi biex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar BCOP qabel ma jissottometti dejta tal-assaġġ BCOP għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Il-metodu ta' ttestjar BCOP huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq perjodu ta' żmien qasir tal-funzjoni fiżjoloġika u bijokimika normali tal-kornea tal-bovini *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza tat-test tiġi vvalutata minn kejl kwantitattiv ta' bidliet fl-opacità u l-permeabilità tal-kornea permezz ta' opacitometru u spettrofotometru ta' daww viżibbli, rispettivament. Iż-żewġ tipi ta' kejl jintużaw biex jiġi kkalkulat IVIS, li jintuża biex tiġi assenjata kategorija ta' klassifikazzjoni ta' periklu ta' irritazzjoni *in vitro* għat-tbassir tal-potenzjal tas-sustanza tat-test li tikkawża irritazzjoni fl-għajnejn *in vivo* (ara l-kriterji tad-Deciżjoni).
12. Il-metodu ta' ttestjar BCOP juża kornej iżolati mill-għajnejn ta' bhejjem li jkunu għadhom kemm inqatlu. L-opacità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' trażmissjoni ta' daww minn ġol-kornea. Il-permeabilità titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' żebgħa fluworexxina tas-sodju li jgħaddi min-naħa għall-oħra tal-ħxuna kollha tal-kornea, kif individwat fil-midjum fil-kavità posterjuri. Is-sustanzi tat-test, li jiġu introdotti fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, jiġu applikati fis-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. L-Appendiċi 3 tipprovdi deskrizzjoni u dijagramma tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea użat fil-BCOP. L-apparat fejn titqiegħed il-kornea jista' jinxtra minn sorsi differenti jew jista' jinbena.

Is-Sors u l-Età tal-Għajnejn Bovini u l-Għażla tal-Ispicijiet tal-Annimali

13. Bhejjem mibgħuta l-biċċerija tipikament jinqatlu jew għall-konsum mill-bniedem inkella għal użi kummerċjali oħra. Bħala sors ta' kornej għall-użu fil-BCOP jintużaw biss l-annimali b'saħħithom li jitqiesu xierqa biex jidhlu fil-katina tal-ikel tal-bniedem. Minhabba li l-bhejjem għandhom skala wiesgħa ta' piżijiet, skont ir-razza, l-età u s-sess, mhemmx piż irakkomandat għall-annimal meta jiġi biex jinqatel.
14. Meta jintużaw għajnejn minn annimali ta' età differenti jistgħu jirriżultaw varjazzjonijiet fid-dimensjonijiet tal-kornej. Kornej b'dijametru orizzontali > 30,5 mm u valuri tal-ħxuna ċentrali tal-kornea (CCT) $\geq 1\ 100\ \mu\text{m}$ ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom aktar minn tmien snin, filwaqt li daww b'dijametru orizzontali < 28,5 mm u CCT < 900 μm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom anqas minn hames snin (14). Minhabba f'hekk, għajnejn minn bhejjem li jkollhom aktar minn 60 xahar tipikament ma jintużawx. Għajnejn minn bhejjem li jkollhom anqas minn 12-il xahar tradizzjonalment ma ntuzawx għaliex l-għajnejn ikunu għadhom qegħdin jizviluppaw u l-ħxuna tal-kornea u d-dijametru tal-kornea jkunu iżgħar b'mod konsiderevoli minn daww irrapportati għall-għajnejn mill-bhejjem adulti. Madankollu, l-użu ta' kornej minn annimali iżgħar (*i.e.*, ta' età minn 6 xhur sa 12-il xahar) huwa permess minhabba li hemm xi vantaġġi, bħal pereżempju disponibilità akbar, skala dejqa ta' etajiet, u inqas perikli marbuta ma' esponiment potenzjali tal-haddiema għall-Enċefalopatija Spongiforma Bovina (15). Minhabba li aktar evalwazzjoni tal-effett tad-daqs jew il-ħxuna tal-kornea fuq is-sensibilità għal sustanzi korrużivi u irritanti tkun utli, l-utenti huma inkoraġġuti jirrapportaw stima tal-età u/jew il-piż tal-annimali li jipprovdu l-kornej użati fi studju.

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

15. L-għajnejn jingabru mill-impjegati tal-biċċerija. Sabiex kemm jista' jkun titnaqqas kull tip ta' ħsara fl-għajnejn, kemm dik mekkanika kif ukoll tipi oħra ta' ħsara, l-għajnejn għandha titneħħa mill-hofra tagħha mill-aktar fis possibbli wara l-mewt. Sabiex jiġi evitat l-esponiment tal-għajnejn għal sustanzi potenzjalment irritanti, l-impjegati tal-biċċerija ma għandhomx jużaw deterġenti meta jlahilhu ras l-annimal.
16. L-għajnejn għandhom jingħaddsu kompletament f'soluzzjoni tal-melħ ekwibrata ta' Hanks, (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) f'preċipjent ta' daqs adattat, u ttrasportati lejn il-laboratorju b'mod li kemm jista' jkun inaqqas id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. Minhabba li l-għajnejn jingabru waqt il-proċess tal-qatla, dawn jistgħu jiġu esposti għad-demem u għal sustanzi bijoloġiċi oħra, inklużi batterji u mikroorganizmi oħra. Għalhekk huwa importanti li jiġi żgurat li r-riskju ta' kontaminazzjoni jitnaqqas kemm jista' jkun (eż. billi r-recipient li jkun fih l-għajnejn jinżamm fuq silġ imxarrab, billi jizdiedu antibjotiċi fl-HBSS li tintuża għall-ħżin tal-għajnejn waqt it-trasport [eż. 100 IU/mL ta' penicillina u 100 mg/mL ta' streptomycin]).
17. L-intervall tal-hin li jgħaddi minn meta jingabru l-għajnejn u l-kornej jintużaw fil-BCOP għandu jitnaqqas kemm jista' jkun (tipikament għandhom jingabru u jintużaw fl-istess ġurnata) u għandu jintwera li dan ma jikkompromettix ir-riżultati tal-assaġġ. Dawn ir-riżultati huma bbażati fuq il-kriterji tal-għażla għall-għajnejn, kif ukoll ir-reazzjonijiet tal-kontrolli pożittivi u negattivi. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'ġurnata speċifika.

Kriterji tal-Għażla għall-Għajnejn Użati fl-BCOP

18. Malli jaslu fil-laboratorju l-għajnejn jiġu eżaminati bir-reqqa għad-difetti inklużi zieda fl-opacità, grif u neovaskularizzazzjoni. Għandhom jintużaw biss il-kornej minn għajnejn li ma jkollhom l-ebda difett ta' dan it-tip.
19. Il-kwalità ta' kull kornea tiġi evalwata wkoll fi stadji li jokkorru aktar 'il quddiem fl-assaġġ. Kornej li jkollhom opacità akbar minn seba' unitajiet ta' opacità (NOTA: l-opacitometru għandu jkun ikkalibrat mal-istandards ta' opacità li jintużaw biex jiġu stabbiliti l-unitajiet ta' opacità, ara l-Appendiċi 3) wara perjodu inizjali ta' ekwilibrizzazzjoni ta' siegħa għandhom jintremew.
20. Kull grupp ta' trattament (sustanza tat-test, kontrolli negattivi u pożittivi konkorrenti) jikkonsisti minn minimu ta' tliet għajnejn. Fl-assaġġ BCOP għandhom jintużaw tliet kornej għall-kontroll negattiv. Minhabba li l-kornej kollha jinqatgħu barra mill-globu shih, u jitqiegħdu fil-kavitajiet tal-kornej, il-manipulazzjoni tagħhom tista' tirriżulta f'arte-fatti fil-valuri tal-opacità u l-permeabilità tal-kornej individwali (inkluż il-kontroll negattiv). Barra minn hekk, il-valuri tal-opacità u l-permeabilità mill-kornej tal-kontroll negattiv jintużaw biex jikkoreġu l-valuri tal-opacità u l-permeabilità tal-kornej tal-oġġett tat-test u l-kornej tal-kontroll pożittiv fil-kalkoli tal-IVIS.

PROCEDURA

Preparazzjoni tal-Għajnejn

21. Kornej li ma jkollhom l-ebda difett jiġu ddissektati b'tali mod li jibqa' minn 2 sa 3 cm ta' xifer tal-isklerotika sabiex jgħin il-manipulazzjoni sussegwenti, u dan isir b'attenzjoni sabiex tiġi evitata kwalunkwe ħsara fl-epitelju u l-endotelju. Kornej iżolati jitqiegħdu f'apparat fejn titqiegħed il-kornea ddisinjat speċjalment għal dan il-ghan li jikkonsisti f'kavitajiet anterjuri u posterjuri, li jkun f'kontatt mal-ġenb epiteljali u l-ġenb endoteljali tal-kornea, rispettivament. Iz-żewġ kavitajiet jintlew sax-xifer bil-midjum essenzjali minimu ta' Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) (l-ewwel il-kavità posterjuri), filwaqt li jiġi żgurat li ma jiffirmawx b'żiejaq. L-apparat imbagħad jiġi kkalibrat għal tal-anqas siegħa f'temperatura ta' $32 \pm 1^\circ\text{C}$ sabiex il-kornej jekwilibrav mal-midjum u jiksbu kemm jista' jkun possibbli attività metabolika normali (it-temperatura approssimattiva tas-superfiċje tal-kornea *in vivo* hija 32°C).
22. Wara l-perjodu ta' ekwilibrizzazzjoni, EMEM frisk u msahħan minn qabel jiżdied fiż-żewġ kavitajiet u jittiehed l-ewwel qari tal-valuri tal-opacità għal kull kornea. Kwalunkwe kornea li jkollha ħsara makroskopika fit-tessut tagħha (eż., grif, pigmentazzjoni, neovaskularizzazzjoni) jew opacità > 7 unitajiet ta' opacità tintrema. L-opacità medja tal-kornej kollha ekwilibrati tiġi kkalkulata. Minimu ta' tliet kornej b'valuri ta' opacità qrib il-valur medjan għall-kornej kollha jintgħażlu bħala kornej għall-kontroll negattiv (jew solvent). Il-kornej li jibqa' jiġu ddistribwiti fi grupp ta' trattament u ta' kontroll pożittiv.
23. Minhabba li l-kapaċità tas-shana tal-ilma hija oghla minn dik tal-arja, l-ilma jipprovdri kundizzjonijiet ta' temperatura aktar stabbli għall-inkubazzjoni. Għalhekk, huwa rrakkomandat l-użu ta' banju tal-ilma sabiex l-apparat fejn titqiegħed il-kornea u l-kontenut tiegħu jinżammu f'temperatura ta' $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Madankollu, jistgħu jintużaw ukoll inkubaturi tal-arja, filwaqt li jittiehdu prekawzjonijiet sabiex tinżamm l-istabilità tat-temperatura (eż., billi l-apparat u l-midja jissahħnu minn qabel).

Applikazzjoni tas-Sustanza tat-Test

24. Jintużaw żewġ protokoll ta' trattament, wieħed għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi (solidi jew likwidi), u ieħor għal solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi.
25. Il-likwidi jiġu ttestjati meta ma jkunux iddilwiti, filwaqt li l-aġenti tensjoattivi jiġu ttestjati f'koncentrazzjoni ta' 10 % w/v f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0,9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. Semisolidi, kremi u x-xema' kollha tipikament jiġu ttestjati bħala likwidi. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xierqa għal koncentrazzjonijiet ta' dilwizzjoni alternattivi. Il-kornej jiġu esposti għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi għal 10 minuti. L-użu ta' hinijiet oħra ta' esponiment għandu jkun abbażi ta' raġuni xjentifika xierqa.
26. Solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi tipikament jiġu ttestjati bħala soluzzjonijiet jew suspensjonijiet f'koncentrazzjoni ta' 20 % f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0,9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. F'ċerti ċirkostanzi u b'ġustifikazzjoni xjentifika xierqa, is-solidi jistgħu jiġu ttestjati puri b'applikazzjoni diretta fuq is-superfiċje tal-kornea permezz tal-metodu tal-kavità miftuħa (ara l-paragrafu 29). Il-kornej jiġu esposti għas-solidi għal erba' sigħat, iżda bħal ma jsir għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi, jistgħu jintużaw hinijiet ta' esponiment alternattivi abbażi ta' raġuni xjentifika xierqa.
27. Jistgħu jintużaw metodi ta' trattament differenti, skont in-natura fiżika u l-karatteristiċi kimiċi (eż. solidi, likwidi, likwidi viskużi jew mhux viskużi) tas-sustanza tat-test. Il-fattur kritiku huwa li jiġi żgurat li s-sustanza tat-test tkopri b'mod xieraq is-superfiċje tal-epitelju u li titneħħa b'mod xieraq waqt l-istadji tat-tlaħlil. Metodu tal-kavità magħluqa tipikament jintuża għal sustanzi tat-test li jvarjaw minn likwidi mhux viskużi għal likwidi viskużi ftit, filwaqt li metodu tal-kavità miftuħa tipikament jintuża għal sustanzi tat-test li jvarjaw minn likwidi semiviskuzi għal likwidi viskużi u għal solidi puri.

28. Fil-metodu tal-kavità magħluqa, ammont tas-sustanza tat-test (750 µL) li jkun biżżejjed biex ikopri l-kavità anterjuri jiġi introdott minn ġot-toqob tal-iddożar fuq is-superfiċje ta' fuq tal-kavità, u t-toqob sussegwentement jiġu ssiġillati bit-tappieri tal-kavità waqt l-esponiment. Huwa importanti li jiġi żgurat li kull kornea tiġi esposta għas-sustanza tat-test għall-intervall tal-hin xieraq.
29. Fil-metodu tal-kavità miftuħa, iċ-ċirku li jsakkar it-tieqa u t-tieqa tal-ħġieġ jitnehhew mill-kavità anterjuri qabel ma jibda t-trattament. Il-kontroll jew is-sustanza tat-test (750 µL, jew biżżejjed sustanza tat-test biex tkopri l-kornea kompletament) jiġi/tiġi applikat(a) direttament fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea permezz ta' mikropipetta. Jekk sustanza tat-test ma tkunx tista' tiġi ppipeppata faċilment, is-sustanza tat-test tista' tingħibed permezz tal-pressjoni f'pipetta bi spostament pożittiv sabiex jiġi ffaċilitat l-iddożar. Il-ponta tal-pipetta bi spostament pożittiv, tiddaħhal fil-ponta tad-distribuzzjoni tas-siringa sabiex il-materjal ikun jista' jingħibed fil-ponta tal-pipetta taħt pressjoni. Imbagħad jehtieġ li l-pistun tal-pipetta jingħibed 'il fuq fl-istess waqt li l-pistun tas-siringa jingħafas 'l isfel. Jekk fil-ponta tal-pipetta jiffurmaw xi bżieġaq tal-arja, is-sustanza tat-test għandha titneħħa (tinħareġ 'il barra) u l-proċess jiġi ripetut sa mal-ponta timtela mingħajr ma jkun hemm bżieġaq tal-arja. Jekk ikun meħtieġ, tista' tintuża siringa normali (mingħajr labra) minhabba li din tippermetti l-kejl ta' volum akkurat tas-sustanza tat-test u applikazzjoni eħfef fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. Wara l-iddożar, it-tieqa tal-ħġieġ terġa' titqiegħed fuq il-kavità anterjuri biex terġa' tinholoq sistema magħluqa.

Inkubazzjoni wara l-esponiment

30. Wara l-perjodu ta' esponiment, is-sustanza tat-test, is-sustanza tal-kontroll negattiv, jew tal-kontroll pożittiv titneħħa mill-kavità anterjuri u l-epitelju jinhasel tal-anqas tliet darbiet (jew sakemm ma tkun tista' tiġi osservata l-ebda evidenza viziva tas-sustanza tat-test) bl-EMEM (li jkun fih il-fenol aħmar). Midjum li jkun fih il-fenol aħmar jintuża għat-tlaħliħ minhabba li bidla fil-kulur tal-fenol aħmar tista' tiġi mmonitorjata sabiex tiġi ddeterminata l-effikaċja tat-tlaħliħ ta' materjali aċidużi jew alkalini. Il-kornej jinhaslu aktar minn tliet darbiet jekk il-fenol aħmar jibqa' jibdel il-kulur (isfar jew vjola), jew is-sustanza tat-test tkun għadha viżibbli. Ladarba l-midjum ma jibqagħlux sustanza tat-test, il-kornej jitlaħhalu għall-aħhar darba bl-EMEM (mingħajr fenol aħmar). L-EMEM (mingħajr fenol aħmar) jintuża għall-aħhar tlaħliħ sabiex jiġi żgurat li l-fenol aħmar jitneħħa kompletament mill-kavità anterjuri qabel ma titkejjel l-opacità. Il-kavità anterjuri mbagħad terġa' timtela b'EMEM frisk mingħajr fenol aħmar.
31. Għal-likwidi jew l-aġenti tensjoattivi, wara t-tlaħliħ, il-kornej jiġu inkubati għal sagħtejn oħra ftemperatura ta' $32 \pm 1^\circ\text{C}$. F'ċerti ċirkostanzi hin itwal ta' inkubazzjoni wara l-esponiment jista' jkun utli. Dan għandu jitqies skont il-każ. Kornej trattati b'solidi jitlaħhalu kompletament fi tmiem il-perjodu ta' esponiment li jidm erba' sigħat, iżda ma jehtigux aktar inkubazzjoni.
32. Fi tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni wara l-esponiment għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi u fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' erba' sigħat għas-solidi li mhumix aġenti tensjoattivi, jiġu rreġistrati l-opacità u l-permeabilità ta' kull kornea. Barra minn hekk, kull kornea tiġi osservata b'mod viżiv u l-osservazzjonijiet pertinenti jiġu rreġistrati (eż. tqaxxir tat-tessuti, sustanza tat-test residwa, opacità mhux uniformi). Dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu importanti għax jistgħu jiġu riflessi minn varjazzjonijiet fil-qari tal-valuri tal-opacitometru.

Sustanzi ta' Kontroll

33. Kontrolli negattivi jew tas-solvent/tal-midjum u kontrolli pożittivi jiġu inklużi b'mod konkorrenti f'kull esperiment.
34. Meta sustanza likwida tiġi ttestjata f'100 %, kontroll negattiv (eż., soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0,9 % jew ilma distillat) jiġi inkluż fil-metodu ta' ttestjar BCOP sabiex bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test ikunu jistgħu jiġu individwati u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti tat-tmiem tal-assaġġ. Dan jiżgura wkoll li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx b'mod li mhux xieraq f'reazzjoni irritanti.
35. Meta jiġi ttestjat likwidu dilwit, aġent tensjoattiv jew solidu fil-metodu ta' ttestjar BCOP, b'mod konkorrenti, jiġi inkluż grupp ta' kontroll tas-solvent/tal-midjum sabiex bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test ikunu jistgħu jiġu individwati u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti tat-tmiem tal-assaġġ. Jista' jintuża biss solvent/midjum li jkun intwera li ma għandu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.
36. F'kull esperiment jiġi inkluż irritant għall-ghajnejn magħruf sabiex jiġi vverifikat li tkun giet ikkawżata reazzjoni xierqa. Minhabba li l-assaġġ BCOP qed jintuża f'dan it-test biex jidentifika sustanzi korrużivi jew irritanti severi, idealment il-kontroll pożittiv għandu jkun sustanza ta' referenza li tipprovoka reazzjoni severa f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata, id-daqs tar-reazzjoni irritanti ma għandux ikun eċċessiv.
37. Id-dimetilformamid jew l-idrossidu tas-sodju 1 % huma eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi tat-test likwidi. Eżempju ta' kontroll pożittiv għal sustanzi tat-test solidi huwa l-imidażol 20 % (piż mqabbel mal-volum) f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju 0,9 %.

38. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew prodotti jikkawżaw irritazzjoni għall-ghajnejn, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-ghajnejn tikkawża irritazzjoni fi hdan skala speċifika ta' reazzjonijiet ta' sustanzi irritanti.

Punti tat-Tmim Imkejla

39. L-opacità tiġi ddeterminata mill-ammont ta' trażmissjoni ta' dawl minn ġol-kornea. L-opacità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' opacitometru, li jagħti valuri ta' opacità fuq skala kontinwa.
40. Il-permeabilità tiġi ddeterminata mill-ammont taż-żeġġha fluworexxina tas-sodju li tippenetra s-saffi kollha taċ-ċelluli tal-kornea (i.e., l-epitelju fuq is-superfície esterna tal-kornea għal ġol-endotelju fuq is-superfície interna tal-kornea). 1 mL ta' soluzzjoni ta' fluworexxina tas-sodju (4 jew 5 mg/mL meta jiġu ttestjati likwidi jew aġenti tensjoattivi jew solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi, rispettivament) jiżdied fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, li tkun f'kuntatt mal-ġenb epiteljali tal-kornea, filwaqt li l-kavità posterjuri, li tkun f'kuntatt mal-ġenb endoteljali tal-kornea, timtela b'EMEM frisk. L-apparat imbagħad jiġi inkubat f'pożizzjoni orizzontali għal 90 ± 5 minuta f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. L-ammont ta' fluworexxina tas-sodju li jgħaddi għal ġol-kavità posterjuri jitkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' spettrofotometru UV/VIS. Kejl spettrofotometriku evalwat f'490 nm jiġi rreġistrat bħala densità ottika (OD_{490}) jew valuri ta' assorbanza li jitkejlu fuq skala kontinwa. Il-valuri ta' permeabilità tal-fluworexxina jiġu ddeterminati bl-użu ta' valuri ta' OD_{490} abbażi ta' spettrofotometru viżibbli li juża traġitt ottiku standard ta' 1 cm.
41. Alternattivament, jista' jintuża qarrej tal-folja tal-mikrotitrazzjoni b'96 bir sakemm; (i) tkun tista' tiġi stabbilita l-iskala ta' valuri lineari tal-qarrej tal-folja għad-determinazzjoni tal-valuri OD_{490} ; u (ii), jintuża l-volum korrett ta' kampjuni tal-fluworexxina fuq il-folja ta' 96 bir sabiex jinkisbu valuri ta' OD_{490} ekwivalenti għat-traġitt ottiku standard ta' 1 cm (dan jista' jkun li jkun jehtieg bir mimli kompletament [generalment 360mL]).

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

42. Ladarba l-valuri (OD_{490}) tal-opacità u l-permeabilità medja jkun għew ikkoreġuti għall-opacità tal-isfond u l-valuri OD_{490} tal-permeabilità tal-kontroll negattiv, il-valuri medji OD_{490} tal-opacità u l-permeabilità għal kull grupp ta' trattament għandhom jiġu kkombinati f'formula dderivata empirikament sabiex jiġi kkalkulat punteġġ tal-irritanza *in vitro* (IVIS) għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

$$IVIS = \text{valur medju tal-opacità} + (15 \times \text{valur } OD_{490} \text{ medju tal-permeabilità})$$

Sina *et al.* (16) irrapportaw li din il-formula għet idderivata matul studji interni u bejn laboratorju u iehor. Id-dejta ġġenerata għal serje ta' 36 kompost fi studju fost bosta laboratorji għet soġġetta għal analiżi b'varjabbli multipli sabiex tiġi ddeterminata l-ekwazzjoni tal-aqwa adattament bejn id-dejta *in vivo* u dik *in vitro*. Din l-analiżi twettqet minn xjenzati f'żewġ kumpaniji separati, li dderivaw ekwazzjonijiet kważi identiċi.

43. Il-valuri tal-opacità u tal-permeabilità għandhom jiġu evalwati wkoll b'mod indipendenti sabiex jiġi ddeterminat jekk sustanza tat-test tkunx ipprovokat korrużività jew irritazzjoni severa permezz ta' wiehed biss miż-żewġ punti tat-tmim (ara l-Kriterji tad-Deciżjoni).

Kriterji tad-Deciżjoni

44. Sustanza li tipprovoka IVIS $\geq 55,1$ tiġi ddefinita bħala sustanza korrużiva jew irritant sever. Skont il-paragrafu 1, jekk is-sustanza tat-test ma tiġix identifikata bħala korrużiva għall-ghajnejn jew irritant sever, għandu jitwettagħ aktar ittestjar għall-finijiet ta' klassifikazzjoni u ttikkettar. Il-metodu ta' ttestjar BCOP għandu akkuratizza kumplessiva ta' 79 % (113/143) sa 81 % (119/147). rata pożittiva falza ta' 19 % (20/103) sa 21 % (22/103), u rata negattiva falza ta' 16 % (7/43) sa 25 % (10/40), meta mqabbel mad-dejta, tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* li jsir fuq ghajnejn il-fniek, ikklassifikata skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-EPA (1), l-UE (2), jew il-GHS (3). Meta sustanzi f'ċerti klassijiet kimiċi (i.e., alkohols, ketoni) jew fiżiċi (i.e., solidi) ikunu esklużi mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-BCOP skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS tvarja minn 87 % (72/83) sa 92 % (78/85), ir-rati ta' pożittivi foloz ivarjaw minn 12 % (7/58) sa 16 % (9/56), u r-rati ta' negattivi foloz ivarjaw minn 0 % (0/27) sa 12 % (3/26).
45. Anke jekk għas-sustanza tat-test ma tinkiseb l-ebda klassifikazzjoni ta' sustanza korrużiva jew irritant sever għall-ghajnejn, id-dejta BCOP tista' tkun utli, flimkien mad-dejta tat-test *in vivo* li jsir fuq ghajnejn il-fniek jew minn test *in vitro* vvalidat kif xieraq, sabiex jiġu evalwati aktar il-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar BCOP kif ukoll kemm dan huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumiex severi u sustanzi li mhumiex irritanti (qed jiġi żviluppat Dokument ta' Gwida dwar l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* fuq l-ghajnejn).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni ta' Studju

46. Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontroll pożittiv jaghti IVIS li jkun fi hdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika attwali, li tiġi aġġornata tal-anqas kull tliet xhur, jew kull darba li jitwettaq test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet ma jitwettqux b'mod frekwenti (*i.e.*, anqas minn darba fix-xahar). Ir-reazzjonijiet mill-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-midjum għandhom jirriżultaw f'valuri ta' opacità u permeabilità li jkunu anqas mill-ogħla limiti stabbiliti għall-valuri tal-opacità u l-permeabilità tal-isfond għall-kornej bovini trattati bil-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-midjum rispettiv.

Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi t-tagħrif li ġej, jekk ikun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll

Isem/ismijiet kimiku/kimiċi pereżempju l-isem strutturali użat mir-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi (CAS), u ismijiet ohra, jekk ikunu magħrufa;

In-Numru tar-Reġistru CAS (RN), jekk ikun magħruf;

Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew it-tahlita (f'percentwal(i) skont il-piż), sakemm dan it-tagħrif ikun disponibbli;

Proprietajiet fiżikokimiċi bhall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

It-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (*eż.*, it-tishin, it-thin);

L-istabilità, jekk tkun magħrufa.

Tagħrif dwar l-Ispenser u l-Istallazzjoni tat-Test

L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-istallazzjoni tat-test u tad-direttur tal-istudju;

Identifikazzjoni tas-sors tal-ġhajnejn (*i.e.*, l-istallazzjoni minn fejn ingabru);

Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-hżin tal-ġhajnejn (*eż.*, id-data u l-hin meta ngabru l-ġhajnejn, l-intervall tal-hin qabel ma nbeda t-test, il-midja tat-trasport u l-kundizzjonijiet tat-temperatura, kwalunkwe antibijotiku li ntuża);

Jekk disponibbli, karatteristiċi speċifiċi tal-annimali minn fejn ingabru l-ġhajnejn (*eż.*, età, sess, piż tal-annimal donatur).

*Ġustifikazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar u tal-Protokoll Użati**Integrità tal-Metodu ta' Ttestjar*

Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (*i.e.*, akkuratezza u affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar tul iż-żmien (*eż.*, ittestjar perijodiku ta' sustanzi ta' profiċjenza, użu ta' dejta storika ta' kontrolli negattivi u pożittivi).

Kriterji għal Test Aċċettabbli

Firxiet aċċettabbli ta' kontrolli pożittivi u negattivi konkurrenti bbażati fuq dejta storika;

Jekk applikabbli, firxiet aċċettabbli ta' punti ta' riferiment ta' kontroll konkurrenti bbażati fuq dejta storika.

Kundizzjonijiet tat-Test

Deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata;

Tip ta' apparat li ntuża għat-tqeghid tal-kornea;

Tagħrif dwar kalibrazzjoni għal apparat użat għall-kejl tal-opacità u l-permeabilità (*eż.*, opacitometru u spettrometru);

Tagħrif dwar il-kornej bovini użati, inklużi dikjarazzjonijiet rigward il-kwalità tagħhom;

Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

Konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test użata;

Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

Referenza għad-dejta storika tal-mudell (eż., kontrolli negattivi u pożittivi, sustanzi ta' profiċjenza, sustanzi ta' riferiment);

Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati.

Riżultati

Tabulazzjoni ta' dejta minn kampjuni individwali tat-test (eż., valuri ta' opaċità u ta' OD₄₉₀ u IVIS ikkalkulati għas-sustanza tat-test u l-kontrolli pożittivi, negattivi u ta' riferiment [jekk inklużi], irrappurtati f'forma tabulari, inkluża dejta minn esperimenti ripetuti ta' replikazzjoni kif ikun xieraq, u medji ± id-devjazzjoni standard għal kull esperiment);

Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati.

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

LETTERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlittiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Disponibbli fuq:

[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. Disponibbli fuq:

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

- (5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq:

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

- (6) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-Registrazzjoni, il-Valutazzjoni, l-Awtorizzazzjoni u r-Restrizzjoni ta' Sustanzi Kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni. ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.

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

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq:
- [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. Disponibbli fuq:
- [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 Center 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. Disponibbli fuq:
- [<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. Disponibbli fuq:
- [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. Disponibbli fuq:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Din hija miżura tar-rendiment tal-metodu ta' ttestjar u aspekk wieħed ta' "rilevanza." It-terminu spiss jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza", biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati pożittivi ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza ta' riferiment: Sustanza użata bħala standard għal paragun ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprietajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi li tkun qed tiġi ttestjata; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fl-iskala tar-reazzjoni mixtieqa.

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-ghajn li tkopri l-habba tal-ghajn u l-pupilla u thalli d-dawl jghaddi għal gol-parti interna tal-ghajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' hsara fil-kornea. L-opaċità tista' tiġi evalwata b'mod sugġettiv kif isir fit-test Draize li jsir fuq ghajnejn il-fniek, jew b'mod ogġettiv bi strument bħal pereżempju "opaċitometru".

Permeabilità tal-kornea: Kejl kwantitattiv tal-hsara fl-epitelju tal-kornea billi jiġi ddeterminat l-ammont ta' żebgħa fluworexxina tas-sodju li tghaddi minn ġos-saffi kollha taċ-ċelluli tal-kornea.

Kategorija tal-EPA 1: Korruziv (qerda irriversibbli tat-tessut tal-kornea) jew involviment tal-kornea jew irritazzjoni li tippersisti għal aktar minn 21 jum (1).

Kategorija tal-UE R41: Produzzjoni ta' hsara fit-tessut tal-ghajn, jew thassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajn, li ma jkunx kompletament riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (2).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inkluzi min iħaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-haddiema tal-emergenza) u l-ambjent (3).

Kategorija tal-GHS 1: Produzzjoni ta' hsara fit-tessut tal-ghajn, jew thassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajn, li ma jkunx kompletament riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (3).

Periklu: Proprietà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandha l-potenzjal tikkawża effetti avversi meta organizzmu, sistema jew (sub) popolazzjoni jiġi/tiġi espost(a) għal dak l-aġent.

Punteġġ tal-Irritanza In Vitro (IVIS): Formula dderivata empirikament użata fl-assaġġ BCOP fejn il-valuri medji tal-opaċità u tal-permeabilità għal kull grupp ta' trattament jiġu kkombinati f'punteġġ *in vitro* wiehed għal kull grupp ta' trattament. $L-IVIS = \text{valur medju tal-opaċità} + (15 \times \text{valur medju tal-permeabilità})$.

Kontroll negattiv: Replikazzjoni mhux trattata li fiha l-komponenti kollha tas-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza tat-test u kampjuni ta' kontroll ohra sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanzi li mhumix irritanti: Sustanzi li mhumix ikklassifikati bħala Kategorija I, II, jew III tal-EPA; Kategorija R41 jew R36 tal-UE; jew Kategorija tal-GHS 1, 2A, jew 2B irritanti għall-ghajnejn.

Sustanza korrużiva għall-ghajnejn: (a) Sustanza li tikkawża hsara irriversibbli fit-tessut tal-ghajn; (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-ghajnejn (1) (2) (3).

Irritant għall-ghajnejn: (a) Sustanza li tipproduċi bidla riversibbli fl-ghajn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajn; (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija I jew II tal-EPA, Kategorija R36 tal-UE, jew Kategorija 2A jew 2B tal-GHS irritanti għall-ghajnejn (1) (2) (3).

Irritant sever għall-ghajnejn: (a) Sustanza li tikkawża hsara fit-tessut tal-ghajnejn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajnejn u li ma titlaqx fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża thassir fiżiku serju tal-vista; (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-ghajnejn (1) (2) (3).

Opacitometru: Strument li jintuża sabiex titkejjel "l-opacità tal-kornea" billi jevalwa b'mod kwantitattiv it-trażmissjoni tad-dawl minn għol-kornea. L-istrument tipiku jkollu żewġ kompartimenti, kull wiehied minnhom b'sors ta' dawl u fotoċellula tiegħu stess. Kompartiment minnhom jintuża għall-kornea trattata, filwaqt li l-iehor jintuża biex jikkalibra u jiżżera l-istrument. Dawl minn bozza tal-alogenu jitghadda minn go kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal go fotoċellula u jitqabbel mad-dawl mgħoddi minn għol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal go fotoċellula. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelluli titqabbel u valur numeriku ta' opacità jidher fuq displej diġitali.

Kontroll pożittiv: Replikazzjoni li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-reazzjoni severa ma għandux ikun eċċessiv.

Affidabilità: Qies ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettagħ b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettagħ skont l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Kontroll ta' solvent/midjum: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha tas-sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-midjum li jiġi pproċessat mas-sustanza tat-test trattata u kampjuni ta' kontroll ohra sabiex tiġi stabbilita l-ewwel reazzjoni għall-kampjuni trattati mis-sustanza tat-test mahlula fl-istess solvent jew midjum. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-midjum ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Ittestjar imtarraġ: Strateġija ta' ttestjar pass pass fejn it-tagħrif kollu dwar sustanza tat-test jiġi analizzat f'ordni speċifika, permezz ta' proċess fejn titqies l-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed tagħrif disponibbli għal deċiżjoni ta' klassifikazzjoni ta' periklu, qabel ma wiehied jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni jista' jiġi assenjat abbażi ta' tagħrif eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni ma jkunx jista' jiġi assenjat abbażi tat-tagħrif eżistenti proċedura ta' ttestjar sekwenzjali pass pass għandha titwettagħ fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Metodu ta' ttestjar invalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Huwa importanti li wiehied jinnota li metodu ta' ttestjar invalidat jista' jkun li ma jkollux rendiment tajjeb biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u affidabilità sabiex jinstab aċċettabbli għall-ghan propost.

Importanza tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tint-laħaq u tiġi appoġġata konkluzjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza li tkun ta' periklu.

Appendiċi 2

Sustanzi ta' profiċjenza għall-metodu ta' ttestjar BCOP

Qabel l-użu ta' rutina ta' metodu ta' ttestjar li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji jista' jkun li jkunu jixtiequ juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-korrużività għall-ghajnejn ta' 10 sustanzi rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw l-iskala ta' reazzjonijiet ta' irritazzjoni/korrużjoni fl-ghajnejn, li hija bbażata fuq ir-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TG 405) (i.e., il-Kategoriji 1, 2A, 2B, jew Mhux Ikklassifikata u Tikkettata skont il-GHS tan-NU (3) (7). Madankollu, meta jitqies kemm dawn l-assaġġi huma utli b'mod li huwa vvalidat (i.e., biex jiġu identifikati sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-ghajnejn), hemm biss żewġ riżultati għall-finijiet ta' klassifikazzjoni (sustanza korrużiva/irritant sever jew sustanza mhux korrużiva/irritant mhux sever) biex tintwera l-profiċjenza. Kriterji ohra tal-għażla kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli b'mod kummerċjali, ikun hemm disponibbli dejta ta' referenzi ta' kwalità għolja *in vivo*, u li jkun hemm dejta ta' kwalità għolja miż-żewġ metodi *in vitro* li għalihom qegħdin jiġu żviluppati l-Linji Gwida għall-Ittestjar. Għal din ir-raġuni, sustanzi irritanti ntgħażlu mil-lista rrakkomandata mill-ICCVAM ta' 122 sustanza ta' referenza għall-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar ta' tossiċità għall-ghajnejn *in vitro* (ara l-Appendiċi H: Sustanzi ta' Referenza Rrakkomandati mill-ICCVAM) (5). Id-dejta tar-referenzi hija disponibbli fid-Dokumenti ta' Analizi tal-Isfond tal-ICCVAM għall-metodu ta' ttestjar BCOP u ta' Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati (Isolated Chicken Eye, ICE) (17) (18).

Tabella 1

Sustanzi rrakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika mal-BCOP

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ⁽¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni In Vivo ⁽²⁾	Klassifikazzjoni In Vitro ⁽³⁾
Klorur tal-benzal-konju (5 %)	8001-54-5	Kompost ta' onju	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Aċidu dibenżojl-L-tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Imidazol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Aċidu trikloroacetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
2,6-diklorobenż-ojl klorur	4659-45-4	Alid aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Etil-2-metilacetato-ċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2B	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Gliċerol	56-81-5	Alkoħol	Likwidu	Mhux Tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
n-essan	110-54-3	Idrokarbonju (aċiliku)	Likwidu	Mhux tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever

Taqisriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqisriet tas-Sustanzi Kimiċi

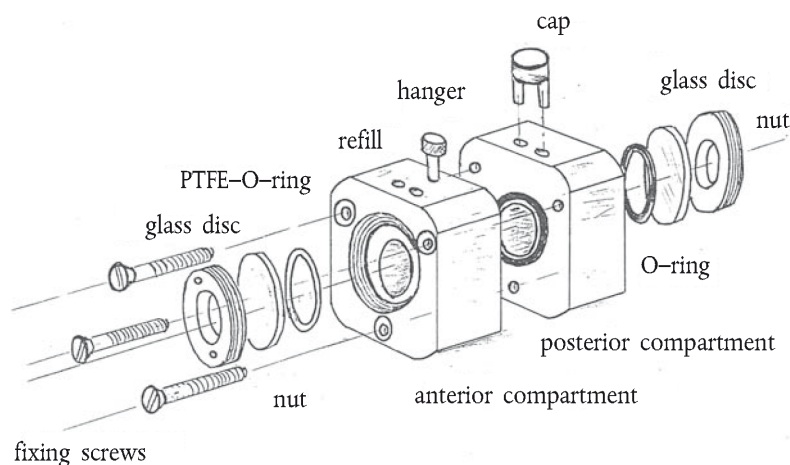
⁽¹⁾ Klassijiet kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, abbażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-librerija nazzjonali tal-intestaturi tas-sugġetti mediċi tal-mediċina (MeSH) (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU (3)(7).⁽³⁾ Abbażi tar-riżultati fil-BCOP u l-ICE.

Appendiċi 3

L-APPARAT TAL-BCOP FEJN TITQIEGHED IL-KORNEA

1. L-apparat tal-BCOP fejn titqiegħed il-kornea huwa magħmul minn materjal inert (eż., polipropilen). L-apparat huwa magħmul minn żewġ nofsijiet (kavità anterjuri u oħra posterjuri), u għandu żewġ kavitajiet interni ċilindriċi simili. Kull kavità tesa' volum ta' 5 mL u hija magħluqa b'tieqa tal-ħġieġ, li minn go fiha jiġi rreġistrat il-kejl tal-opacità. Kull waħda mill-kavitajiet interni hija ta' dijametru ta' 1,7 ċm u fond ta' 2,2 ċm ⁽¹⁾. Iċ-ċirku-o jitqiegħed fil-kavità posterjuri biex jipprevjeni kwalunkwe tnixxija. Il-kornej jitqiegħdu bil-parti tal-endotelju thares 'l isfel fuq iċ-ċirku-o tal-kavitajiet posterjuri u l-kavitajiet anterjuri jitqiegħdu fuq il-parti tal-epitelju tal-kornej. Il-kavitajiet jinżammu f'posthom permezz ta' tliet viti li jinsabu fuq it-truf esterni tal-kavità. Fl-aħhar parti ta' kull kavità nsibu tieqa tal-ħġieġ li tista' titneħħa sabiex ikun hemm aċċess faċli għall-kornea. Ċirku-o jitqiegħed ukoll bejn it-tieqa tal-ħġieġ u l-kavità biex jipprevjeni kwalunkwe nixxija. Żewġ toqbiet fil-parti ta' fuq ta' kull kavità jippermettu l-introduzzjoni u t-neħħija tal-midjum u l-komposti tat-test. Dawn jingħalqu b'tappijiet tal-lastku waqt il-perjodi ta' trattament u ta' inkubazzjoni.

⁽¹⁾ Id-dimensjonijiet provduti huma bbażati fuq apparat fejn titqiegħed il-kornea li jintuża għal baqar ta' età li tvarja minn 12-il xahar sa 60 xahar. Fl-eventwalità li jintużaw annimali ta' età minn 4 xhur sa 12-il xahar, l-apparat minflok ikollu jiġi ddisinjat b'tali mod li kull kavità tesa' volum ta' 4 mL, u kull waħda mill-kavitajiet interni tkun ta' dijametru ta' 1,5 ċm u fond ta' 2,2 ċm. Fi kwalunkwe apparat iddisinjat għal fejn titqiegħed il-kornea, huwa importanti hafna li l-proporzjon tal-erja tas-superfiċje tal-kornea esposta mal-volum tal-kavità posterjuri ikun daqs il-proporzjon fl-apparat tradizzjonali. Dan huwa meħtieġ sabiex jiġi żgurat li l-valuri tal-permeabilità jiġu ddeterminati b'mod korrett għall-kalkolu tal-IVIS permezz tal-formula proposta.



Glossarju

Glass disc: Disk tal-ħġieg

PTFE-O-ring: Ċirku-O tal-PTFE

Refill: Ftuh għall-mili

Hanger: Ganċ

Cap: Tapp

Nut: Skorfinja

O-ring: Ċirku-O

Posterior compartment: Kompartiment posterjuri

Anterior compartment: Kompartiment anterjuri

Fixing screws: Viti għat-twahħil

L-OPACITOMETRU

2. L-opacitometru huwa apparat li jkejjel it-trażmissjoni tad-dawl. Dawl minn bozza tal-alogenu jitghadda minn ġo kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal ġo fotoċellula u jitqabbel mad-dawl mgħoddi minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal ġo fotoċellula. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelluli titqabbel u valur numeriku ta' opacità jidher fuq displej digitali. L-unitajiet tal-opacità huma stabbiliti.
3. L-opacitometru għandu jipprovdi reazzjoni lineari minn skala ta' qari ta' valuri ta' opacità li jkopru l-valuri tal-limiti użati għal klassifiki differenti deskritti mill-Mudell ta' Previżjoni (*i.e.*, sal-valur tal-limitu li jindika korrużività/irritanza severa). Sabiex jiġi żgurat qari ta' valuri lineari u akkurat sa 75-80 unitajiet ta' opacità, jehtieg li l-opacitometru jiġi kkalibrat bl-użu ta' serje ta' kalibraturi. Il-kalibraturi (folji opaki tal-poliester) jitqiegħdu fil-kavità tal-kalibrazzjoni (kavità tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea ddisinjata biex takkomoda l-kalibraturi) u jinqraw fuq l-opacitometru. Il-kavità tal-kalibrazzjoni hija ddisinjata b'tali mod li l-kalibraturi jinżammu bejn wiehded u iehor fl-istess distanza bejn id-dawl u l-fotoċellula fejn ikunu se jitqiegħdu l-kornej waqt il-kejl tal-opacità. L-opacitometru l-ewwel jiġi kkalibrat għal 0 unitajiet ta' opacità bl-użu tal-kavità tal-kalibrazzjoni mingħajr kalibratur. Imbagħad tliet kalibraturi differenti jitqiegħdu fil-kavità tal-kalibrazzjoni wiehded wiehded u jitkejlu l-opacitajiet. Il-kalibraturi 1, 2 u 3 għandhom jirriżultaw f'qari ta' valuri li jkun ugħali għall-valuri stabbiliti tagħhom ta' 75, 150, u 225 unitajiet ta' opacità, rispettivament, $\pm 5\%$.

B. 48 METODU TA' TTESTJAR TA' GHAJNEJN TAT-TIGIEĠ IŻOLATI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KORRUŻIVI U IRRITANTI SEVERI GHALL-GHAJNEJN

DAHLA

1. Il-metodu ta' ttestjar ta' Ghajnejn tat-Tigieġ Iżolati (ICE) huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuza, f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi, sabiex sustanzi u tahlitiet jiġu kklassifikati bħala sustanzi korrużivi u irritanti severi għall-ghajnejn (1) (2) (3). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, irritanti severi huma ddefiniti bħala dawki li jikkawżaw leżjonijiet fl-ghajnejn li jipersistu fil-fenek għal tal-anqas 21 jum wara l-amministrazzjoni. Filwaqt li ma jitqiesx validu bħala sostituzzjoni kompluta għat-test *in vivo* li jsir fuq ghajnejn il-fniek, l-ICE huwa rrakkomandat biex jintuza bħala strateġija ta' ttestjar imtarraġ għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar regolatorji fi hdan dominju speċifiku ta' applikabilità (4) (5). Is-sustanzi u t-tahlitiet tat-test (6) li jkunu pożittivi fl-assaġġ jistgħu jiġu kklassifikati bħala sustanzi korrużivi jew irritanti severi għall-ghajnejn minghajr ma jsir aktar ittestjar fuq il-fniek. Sustanza li tagħti riżultat negattiv tkun tehtieg li tiġi ttestjata fuq il-fniek permezz ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, kif deskritt fil-Linja Gwida għall-Ittestjar tal-OECD 405 (7) (il-kapitolu B.5 ta' dan l-Anness).
2. L-ghan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza tat-test li tikkawża korrużività jew irritanza severa potenzjali kif imkejla mill-hila tas-sustanza li tikkawża tossiċità f'ghajnejn ta' tigieġa mnehhija mill-hofra tagħha. Effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu permezz ta' (i) valutazzjoni kwalitattiva tal-opacità, (ii) valutazzjoni kwalitattiva tal-hsara għall-epitelju abbażi tal-applikazzjoni tal-fluworexxina fl-ghajnejn (żamma tal-fluworexxina), (iii) kejl kwantitattiv ta' żieda fil-hxuna (nefha), u (iv) evalwazzjoni kwalitattiva ta' hsara morfoloġika makroskopika fis-superfiċje. Il-valutazzjonijiet tal-opacità, tan-nefha, u tal-hsara fil-kornea wara l-esponiment għal sustanza tat-test jiġu vvalutati b'mod individwali u jiġu kkombinati sabiex tiġi dderivata Klassifikazzjoni tal-Irritanza għall-Ghajnejn.
3. L-irritanti għall-ghajnejn li jikkawżaw leżjonijiet li jtitlqu fanqas minn 21 jum u sustanzi li mhumex irritanti ġew ittestjati wkoll bl-użu tal-metodu ta' ttestjar ICE. Madankollu, l-akkuratezza u l-kredibilità tal-metodu ta' ttestjar ICE għas-sustanzi fdawn il-kategoriji ma ġewx evalwati b'mod formali.
4. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll tal-metodu ta' ttestjar ICE tal-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interagenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM) (8), li ġie żviluppat b'segwitu għal studju ta' validazzjoni internazzjonali (4) (5) (9), b'kontribuzzjonijiet minghand iċ-Centru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u iċ-Centru Gappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi, u l-Kwalità tal-Hajja TNO tad-Dipartiment tat-Tossikoloġija u Farmakoloġija Applikata (il-Pajjiżi l-Baxxi). Il-protokoll huwa bbażat fuq tagħrif miksub minn protokollu ppubblikati, kif ukoll il-protokoll attwali użat mit-TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. Il-limitazzjonijiet identifikati għal dan il-metodu huma bbażati fuq ir-rata ta' pożittivi foloz għall-alkohols u r-rata ta' negattivi foloz għas-solidi u l-aġenti tensjoattivi (ara l-paragrafu 47) (4). Meta s-sustanzi ta' dawn il-klassijiet kimiċi u fiżiċi jiġu esklużi mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-ICE skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS titjeb b'mod sostanzjali (4). Abbażi tal-ghan ta' dan l-assaġġ (*i.e.*, li jidentifika biss is-sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-ghajnejn), rati ta' negattivi foloz mhumex kritiċi minhabba li tali sustanzi sussegwentement jiġu ttestjati fuq il-fniek jew b'testijiet ohra *in vitro* vvalidati b'mod xieraq, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali b'approċċ ibbażat fuq l-importanza tal-evidenza. Barra minn hekk, il-bażi tad-dejta tal-validazzjoni attwali ma tippermettix evalwazzjoni xierqa ta' whud mill-klassijiet kimiċi jew tal-prodotti (*ež.*, it-tahlitiet). Madankollu, l-investigaturi jistgħu jqsu li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar tat-tipi kollha ta' materjali (inklużi t-tahlitiet), fejn riżultat pożittiv ikun jista' jiġi aċċettat bħala indikattiv ta' reazzjoni għal sustanza korrużiva jew irritant sever għall-ghajnejn. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba bl-alkohols għandhom jiġu interpretati b'ċertu kawtela minhabba r-riskju ta' tbassir żejjed.
7. Il-proċeduri kollha li jinvolvu ghajnejn tat-tigieġ għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-ittestjar fdak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali derivati mill-bnedmin jew l-annimali, li jinkludu, iżda li mhumex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Il-prekawzjonijiet universali tal-laboratorji huma rrakkomandati (15).
8. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar hija dik li, għalkemm il-metodu jqis uħud mill-effetti fuq l-ghajnejn evalwati fil-metodu ta' ttestjar tal-irritanza f'ghajnejn il-fenek u sa ċertu punt is-severità tagħhom, il-metodu ma jqisx feriti fil-konguntiva u fil-habba tal-ghajnejn. Barra dan, għalkemm ir-riversibilità tal-feriti fil-kornea ma tistax tiġi evalwata *per se* fl-assaġġ ICE, ġie propost, abbażi ta' studji fuq ghajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali tal-ferita fil-kornea tista' tintuża biex issir distinzjoni bejn effetti reversibbli u dawki irriversibbli (16). Fl-aħhar nett, il-metodu ta' ttestjar ICE ma jippermettix valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment tal-ghajnejn.
9. Qed isiru sforzi kontinwi sabiex jiġu kkarakterizzati aktar il-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar ICE kif ukoll kemm huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumex severi u sustanzi li mhumex irritanti (ara wkoll il-paragrafu 48). L-utenti qed jiġu inkoraġġuti wkoll jipprovdut lill-organizzazzjonijiet ta' validazzjoni b'kampjuni u/jew dejta għal evalwazzjoni formali ta' użi futuri possibbli tal-metodu ta' ttestjar ICE, inklużi dawki għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumex severi u sustanzi li mhumex irritanti għall-ghajnejn.

10. Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 2. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi biex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-tweġġ tal-metodu ta' ttestjar ICE qabel ma jissottometti dejta tal-ICE għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Il-metodu ta' ttestjar ICE huwa mudell organotipiku li jipprovi manutenzjoni fuq terminu ta' żmien qasir fuq għajnejn it-tigieg *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza tat-test tiġi vvalutata bid-determinazzjoni tan-nefha, l-opacità u ż-żamma tal-fluworessxina fil-kornea. Filwaqt li l-aħħar żewġ parametri jinvolve valutazzjoni kwalitattiva, analiżi tan-nefha fil-kornea tipprovi valutazzjoni kwantitattiva. Kull kejl jew jinqaleb għal punteġġ kwantitattiv li jintuża għall-kalkolu ta' Indiċi ta' Irritazzjoni kumplessiv, inkella jiġi assenjat kategorizzazzjoni kwantitattiva li tintuża biex tiġi assenjata klassifikazzjoni tal-korrużività u l-irritanza severa għall-għajnejn *in vitro*. Kull wiehed minn dawn ir-riżultati mbagħad ikun jista' jintuża biex jipprevedi l-potenzjal ta' sustanza tat-test li tikkawża korrużività u irritanza severa għall-għajnejn *in vivo* (ara l-Kriterji tad-Deċizzjoni).

Sors u Età ta' Għajnejn it-Tigieg

12. Storikament, għal dan l-assaġġ intużaw għajnejn li jkunu ttiehdu mit-tigieg minn biċċerija fejn jinqatlu għall-konsum mill-bniedem, u b'hekk ġiet eliminata l-ħtieġa ta' annimali tal-laboratorju. Jintużaw biss għajnejn ta' annimali b'saħ-hithom li huma xierqa li jidhlu fil-katina alimentari tal-bniedem.
13. Għalkemm ma twettaq l-ebda studju kontrollat għall-valutazzjoni tal-età ideali tat-tigieg, l-età u l-piż tat-tigieg użati storikament f'dan il-metodu ta' ttestjar huma daww ta' tigieg tar-rebbieġha li tradizzjonalment jiġu pproċessati minn biċċerija tat-tjur (*i.e.*, bejn wiehed u iehor ta' età ta' 7 ġimgħat, u piż ta' 1,5 – 2,5 kg).

Għbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

14. L-irjus għandhom jitneħħew immedjatament wara s-sedazzjoni tat-tigieg, ġeneralment b'xokk elettriku u inċizzjoni tal-ghonq għall-fsada. Għandu jiġi lokalizzat sors lokali ta' tigieg qrib il-laboratorju sabiex l-irjus tat-tigieg jiġu ttrasferiti mill-biċċerija sal-laboratorju malajr biżżejjed sabiex kemm jista' jkun jonqos/tonqos id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. L-intervall tal-hin li jgħaddi minn meta jingabru l-irjus tat-tigieg u l-għajnejn jintużaw fil-metodu ta' ttestjar ICE għandu jitnaqqas kemm jista' jkun (tipikament fi żmien sagħtejn) u għandu jintwera li dan ma jikkompromettix ir-riżultati tal-assaġġ. Dawn ir-riżultati huma bbażati fuq il-kriterji tal-għażla għall-għajnejn, kif ukoll ir-reazzjonijiet tal-kontrolli pożittivi u negattivi. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'gurnata speċifika.
15. Minhabba l-fatt li l-għajnejn jiġu ddissektati fil-laboratorju, l-irjus intatti jiġu ttrasportati mill-biċċerija f'temperatura ambjentali f'kaxx tal-plastik umdifikati b'xugamani mxarriba b'soluzzjoni iżotonika ta' ilma bil-melħ.

Kriterji tal-Għażla għall-Għajnejn Użati fl-ICE

16. Għajnejn li jkollhom punteġġ għoli ta' titbiġ bil-fluworessxina (*i.e.*, > 0,5) jew punteġġ għoli ta' opacità fil-kornea (*i.e.*, > 0,5) wara li jitneħħew mill-hofra tal-ghajn jitwarrbu.
17. Kull grupp ta' trattament u kontroll pożittiv konkorrenti jikkonsisti minn tal-anqas tliet għajnejn. Il-grupp ta' kontrolli negattivi jew il-kontroll tas-solvent (jekk jintuża solvent li ma jkunx ilma bil-melħ) jikkonsisti minn tal-anqas għajn waħda.

PROCEDURA

Preparazzjoni tal-Għajnejn

18. Tebqet il-ghajn tinqata' barra b'ħafna attenzjoni sabiex ma ssir l-ebda ħsara fil-kornea. L-integrità tal-kornea tiġi vvalutata malajr b'qatra fluworessxina tas-sodju 2 % (w/v) li tiġi applikata fuq is-superfiċje tal-kornea għal ftit sekondi, u mbagħad titlah b'soluzzjoni iżotonika ta' ilma bil-melħ. Għajnejn trattati bil-fluworessxina mbagħad jiġu eżaminati b'mikroskopju tal-kornea sabiex jiġi żgurat li l-kornea ma jkollha l-ebda ħsara (*i.e.*, punteġġi taż-żamma tal-fluworessxina u tal-opacità tal-kornea ≤ 0,5).
19. Jekk l-ghajn ma jkollha l-ebda ħsara tinqata' aktar, 'il barra mill-kranju b'attenzjoni kbira sabiex ma ssir l-ebda ħsara lill-kornea. Il-boċċa tal-ghajn tingibed mill-orbita billi wiehed iżomm sod il-membrana tat-tegħmiż b'forċipi kirurġiċi, u l-muskoli tal-ghajn jinqatgu b'imqass mgħawweġ u b'ponta spuntata. Huwa importanti li wiehed jevita li jikkawża ħsara fil-kornea minhabba pressjoni eċċessiva (*i.e.*, artefatti ta' kompressjoni).
20. Meta l-ghajn titneħħa mill-orbita, porzjon viżibbli tan-nerv ottiku għandu jibqa' mwahħal. Ladarba titneħħa mill-orbita, l-ghajn titqiegħed fuq kuttunar assorbenti u l-membrana tat-tegħmiż u tessut konnettiv iehor jinqatgu.

21. L-ghajn imnehija mill-hofra tagħha titqiegħed fuq klamp tal-azzar li ma jissaddadx b'tali mod li l-kornea tkun f'pożizzjoni vertikali. Il-klamp imbagħad jiġi ttrasferit f'kavità fl-apparat tas-superfużjoni (16). Il-klampi għandhom jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni b'tali mod li l-kornea kollha tkun qed tiġi provduta bid-dripp tas-soluzzjoni iżotonika tal-ilma bil-melħ. Il-kavitajiet tal-apparat tas-superfużjoni għandu jkollu temperatura kkontrollata ta' $32 \pm 1,5$ °C. L-Appendiċi 3 jipprovi dijjagramma ta' apparat tipiku tas-superfużjoni u l-klampi tal-ghajnejn, li jistgħu jinxtraw jew jinbnew. L-apparat jista' jibiddel sabiex jissodisfa l-htigijiet ta' laboratorju individwali (eż., biex jikko-moda għadd differenti ta' ghajnejn).
22. Wara li jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni, l-ghajnejn jerġgħu jiġu eżaminati b'mikroskopju tal-kornea sabiex jiġi żgurat li ma tkun saritilhom l-ebda hsara waqt il-proċedura tad-dissezzjoni. Il-hxuna tal-kornea fil-quċcata tal-kornea għandha titkejjel ukoll issa bl-użu tal-apparat li jkejjel il-fond fuq il-mikroskopju tal-kornea. Ghajnejn; (i) b'punteġġ ta' żamma ta' fluworexxina ta' $> 0,5$; (ii) opacità tal-kornea $> 0,5$; jew, (iii), kwalunkwe sinjal addizzjonali ta' hsara għandhom jiġu ssostitwiti. Għal ghajnejn li ma jitwarrbux abbażi ta' kwalunkwe minn dawn il-kriterji, ghajnejn individwali bi hxuna tal-kornea li tiddevja b'aktar minn 10 % mill-valur medju għall-ghajnejn kollha għandhom jitwarrbu. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji tal-kornea jistgħu jagħtu kejl differenti ta' hxuna tal-kornea jekk is-setting tal-wisa' tal-fetha tkun differenti. Il-wisa' tal-fetha għandha tkun immontata għal 0,095 mm.
23. Ladarba l-ghajnejn kollha jiġu eżaminati u approvati, l-ghajnejn jiġu inkubati għal madwar 45 sa 60 minuta sabiex jiġu ekwilibriati mas-sistema tat-test qabel l-iddożar. Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, jiġi rreġistrat il-punt zero ta' referenza għall-hxuna u l-opacità tal-kornea sabiex iservi bħala linja ta' bażi (i.e., $h_{in} = 0$). Il-punteġġ tal-fluworexxina ddeterminat fid-dissezzjoni jintuża bħala l-ewwel kejl għal dak il-punt tat-tmiem.

Applikazzjoni tas-Sustanza tat-Test

24. Eżatt wara l-kejl tal-punt zero ta' referenza, l-ghajn (fl-apparat fejn titqiegħed) titneħħa mill-apparat tas-superfużjoni, titqiegħed f'pożizzjoni orizzontali, u s-sustanza tat-test tiġi applikata fuq il-kornea.
25. Sustanzi tat-test likwidi tipikament jiġu ttestjati mhux iddilwiti, iżda jistgħu jiġu ddilwiti jekk dan jitqies neċessarju (eż., bħala parti mit-tfassil tal-istudju). Is-solvent preferut għas-sustanzi dilwiti huwa l-ilma bil-melħ fiżjoloġiku. Madankollu, solventi alternattivi jistgħu jintużaw ukoll taħt kundizzjonijiet kontrollati, iżda għandu jintwera li dawn ikunu solventi xierqa biex jintużaw minflok l-ilma bil-melħ fiżjoloġiku.
26. Sustanzi tat-test likwidi jiġu applikati fuq il-kornea b'tali mod li s-superfiċje shiha tal-kornea tkun miksija b'mod indaqs bis-sustanza tat-test; il-volum standard huwa 0,03 mL.
27. Jekk possibbli, is-sustanzi solidi għandhom jintahnu f'mehriez u lida, sa ma jkunu kemm jista' jkun fini, jew f'għodda tat-thin komparabbli. It-trab jiġi applikat fuq il-kornea b'tali mod li l-kornea tkun miksija b'mod uniformi bis-sustanza tat-test; l-ammont standard huwa 0,03 gm.
28. Is-sustanza tat-test (likwida jew solida) tiġi applikata għal 10 sekondi u mbagħad titlahlah minn fuq l-ghajn bl-ilma bil-melħ iżotoniku (madwar 20 mL) f'temperatura ambjentali. L-ghajn (fl-apparat fejn titqiegħed) imbagħad terġa' titqiegħed fl-apparat tas-superfużjoni fil-pożizzjoni wieqfa originali.

Sustanzi ta' Kontroll

29. Kontrolli negattivi jew tas-solvent/midjum konkurrenti għandhom jiġu inkluzi f'kull esperiment.
30. Meta jkunu qed jiġu ttestjati likwidi f'100 % jew solidi, jintuża ilma bil-melħ fiżjoloġiku bħala kontroll negattiv konkurrenti fil-metodu ta' ttestjar ICE sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'reazzjoni irritanti.
31. Meta jkunu qed jiġu ttestjati likwidi ddilwiti, fil-metodu ta' ttestjar ICE jiġi inkluz grupp ta' kontrolli tas-solvent/-midjum konkurrenti sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'reazzjoni irritanti. Skont il-paragrafu 25, jista' jintuża biss solvent/-midjum li jkun intwera li ma jkollu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

32. F'kull esperiment jiġi inkluz irritant għall-ghajnejn maghruf sabiex jiġi vverifikat li tkun giet ikkawżata reazzjoni xierqa. Minhabba li l-assaġġ ICE qed jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jidentifika sustanzi korrużivi jew irritanti severi, il-kontroll pożittiv għandu jkun sustanza ta' referenza li tikkawża reazzjoni severa f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-reazzjoni severa ma għandux ikun eċċessiv. Għandha tiġi ġġenerata biżżejjed dejta *in vitro* għall-kontroll pożittiv sabiex għall-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi kkalkulata skala ta' valuri ddefiniti statistikament li tkun aċċettabbli. Jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika xierqa tal-metodu ta' ttestjar ICE għal kontroll pożittiv partikolari, jista' jkun mehtieġ li jitwettqu studji li jipprovdu dan it-tagħrif.
33. Eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi tat-test likwidi huma l-aċidu aċetiku 10 % jew il-klorur tal-benzalkonju 5 %, filwaqt li eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi tat-test solidi huma l-idrossidu tas-sodju jew l-imidażol.
34. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li kimiċi mhux maghrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew prodotti jikkawżaw irritazzjoni għall-ghajnejn, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-ghajnejn tikkawża irritazzjoni fi hdan skala speċifika ta' reazzjonijiet ta' sustanzi irritanti.

Punti tat-Tmiem Imkejla

35. Il-kornej trattati jiġu evalwati qabel it-trattament u mbagħad fit-30, fil-75, fil-120, fil-180 u fil-240 minuta (± 5 minuti) wara t-tlaħliha ta' wara t-trattament. Dawn il-punti tal-hin jipprovdu għadd xieraq ta' kejl tul il-perjodu tat-trattament ta' erba' sigħat, filwaqt li jhallu biżżejjed hin jgħaddi bejn kejl u iehor sabiex isiru l-osservazzjonijiet neċessarji li għandhom isiru għall-ghajnejn kollha.
36. Il-punti tat-tmiem evalwati għall-opacità, nefha, żamma tal-fluworessxina fil-kornea u l-effetti morfoloġiċi (eż., thaffir jew illaxkar tal-epitelju). Il-punti tat-tmiem kollha, bl-eċċezzjoni taż-żamma tal-fluworessxina (li tiġi ddeterminata biss qabel it-trattament u 30 minuta wara l-esponiment għas-sustanza tat-test) jiġu ddeterminati f'kull wiehed mill-punti tal-hin imsemmija hawn fuq.
37. It-tehdid ta' ritratti huwa rrakkomandat għad-dokumentazzjoni tal-opacità, iż-żamma tal-fluworessxina, l-effetti morfoloġiċi fil-kornea u, jekk issir, l-istopatoloġija.
38. Wara l-eżami finali li jsir fir-raba' siegħa, l-utenti huma inkoraġġuti jippreservaw l-ghajnejn f'fissattiv xieraq (eż., soluzzjoni buffer ta' formalina newtrali) għal eżami istopatoloġiku possibbli.
39. In-nefha fil-kornea tiġi ddeterminata mill-kejl tal-hxuna fil-kornea li jsir permezz ta' pakimetru ottiku fuq mikroskopju tal-kornea. In-nefha tiġi espressa bħala perċentwal u tiġi kkalkulata mill-kejl tal-hxuna tal-kornea skont il-formula li ġejja:

$$\left(\frac{hxuna\ kornea\ hin\ t - hxuna\ kornea\ hin = 0}{hxuna\ kornea\ hin = 0} \right) \times 100$$

40. Il-perċentwal medju tan-nefha fil-kornea għat-testijiet kollha tal-ghajnejn jiġi kkalkulat għall-punti tal-hin ta' osservazzjoni kollha. Abbażi tal-oghla punteġġ medju għan-nefha fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-hin, jingħata punteġġ tal-kategorija għal kull sustanza tat-test.
41. Għall-punteġġ l-opacità fil-kornea tiġi kkalkulata skont il-parti tal-kornea li tkun opacifikata l-aktar. Il-valur medju tal-opacità fil-kornea għat-testijiet kollha tal-ghajnejn jiġi kkalkulat għall-punti tal-hin ta' osservazzjoni kollha. Abbażi tal-oghla punteġġ medju għall-opacità fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-hin, jingħata punteġġ tal-kategorija għal kull sustanza tat-test (it-Tabella 1).

Tabella 1

Punteġġi tal-opacità tal-kornea

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda opacità
0,5	Opacità hafifa hafna

Punteġġ	Osservazzjoni
1	Partijiet mifruxa jew imxerrda; id-dettalji tal-habba tal-ghajn jidhru b'mod ċar
2	Parti trasluċida li tintlemaħ faċilment; id-dettalji tal-habba tal-ghajn huma kemxejn oskuri
3	Opacità severa fil-kornea; ma jidher l-ebda dettall speċifiku tal-habba tal-ghajn; id-daqs tal-pupilla b'ilkemm jintlemaħ
4	Opacità totali fil-kornea; il-habba tal-ghajn hija invizibbli

42. Il-valur medju taż-żamma tal-fluworexxina għat-testijiet kollha tal-ghajnejn jiġi kkalkulat biss għall-punt tal-hin osservat fit-30 minuta, li juntuża għall-punteġġ kumplessiv tal-kategorija għal kull sustanza tat-test (it-Tabella 2).

Tabella 2

Punteġġi taż-żamma tal-fluworexxina

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda żamma ta' fluworexxina
0,5	Titbigh żgħir hafna ta' ċelluli singli
1	It-titbigh taċ-ċelluli singli mifrux mal-parti ttrattata tal-kornea
2	Titbigh ta' ċelluli singli dens fokali jew konfluwenti
3	Partijiet kbar konfluwenti tal-kornea jżommu l-fluworexxina

43. Effetti morfologiċi inkluż 'thaffir' taċ-ċelluli tal-epitelju tal-kornea, 'illaxkar' tal-epitelju, 'tahrix' tas-superfiċje tal-kornea u 'twahhil' tas-sustanza tat-test mal-kornea. Dawn is-sejbiet jistgħu jvarjaw fis-severità u jistgħu jokkorru b'mod simultanju. Il-klassifikazzjoni ta' dawn is-sejbiet hija suġġettiva skont l-interpretazzjoni tal-investigatur.

DEJTA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

44. Ir-riżultati tal-opacità, in-nefha, u ż-żamma tal-fluworexxina fil-kornea għandhom jiġu evalwati b'mod separat sabiex tinholq klassi separata għal kull punt tat-tmiem. Il-klassijiet tal-ICE għal kull punt tat-tmiem imbagħad jiġu kkombinati biex tinholq Klassifikazzjoni tal-Irritanza għal kull sustanza tat-test.

Kriterji tad-Deciżjoni

45. Ladarba kull punt tat-tmiem ikun ġie evalwat, il-klassijiet tal-ICE jistgħu jiġu assenjati abbażi ta' skala ta' valuri ddeterminata minn qabel. L-interpretazzjoni tal-hxuna tal-kornea (it-Tabella 3), l-opacità (it-Tabella 4), u ż-żamma tal-fluworexxina (it-Tabella 5) bl-użu ta' erba' klassijiet tal-ICE ssir skont l-iskala li ġejjin:

Tabella 3

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għall-hxuna tal-kornea

Nefha Medja tal-Kornea (%) (*)	Klassi tal-ICE
0 sa 5	I
> 5 sa 12	II
> 12 sa 18 (> 75 min wara t-trattament)	II
> 12 sa 18 (≤ 75 min wara t-trattament)	III
> 18 sa 26	III

Nefha Medja tal-Kornea (%) (*)	Klassi tal-ICE
> 26 sa 32 (> 75 min wara t-trattament)	III
> 26 sa 32 (\leq 75 min wara t-trattament)	IV
> 32	IV

(*) Punteggi tan-nefha fil-kornea jkunu applikabbli biss jekk il-hxuna mkejla b'mikroskopju tal-kornea Haag-Streit BP900 b'apparat li jkejjel il-fond nru I u setting tal-wisa' tal-fetha ta' 9½, ekwivalenti għal 0,095 mm. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji tal-kornea jistghu jagħtu kejl differenti ta' hxuna tal-kornea jekk is-setting tal-wisa' tal-fetha tkun differenti.

Tabella 4

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għall-opacità

Medja tal-Puntegg tal-Opacità Massima (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Ara t-Tabella 1.

Tabella 5

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għaž-żamma medja tal-fluworexxina

Medja tal-Puntegg taž-Żamma tal-Fluworexxina fit-30 minuta ta' wara t-trattament (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Ara t-Tabella 2.

46. Il-klassifikazzjoni kumplessiva tal-irritanza *in vitro* għal sustanza tat-test tiġi vvalutata billi tinqara l-klassifikazzjoni ta' irritanza li tikkorrispondi għall-kombinazzjoni tal-kategoriji miksuba għan-nefha fil-kornea, l-opacità fil-kornea, u ž-żamma tal-fluworexxina u bl-applikazzjoni tal-iskema ppreżentata fit-Tabella 6.

Tabella 6

Klassifiki kumplessivi tal-irritanza *in vitro*

Klassifikazzjoni	Kombinazzjonijiet tat-tliet (3) Punti tat-Tmiem
Sustanza Korrużiva/Irritant Sever	$3 \times IV$ $2 \times IV, 1 \times III$ $2 \times IV, 1 \times II$ (*) $2 \times IV, 1 \times I$ (*) Opacità fil-kornea ≥ 3 fit-30 min (tal-anqas f'2 għajnejn) Opacità fil-kornea = 4 fi kwalunkwe hin (tal-anqas f'żewġ (2) għajnejn) Illaxkar sever tal-epitelju (tal-anqas f'għajn waħda (1))

(*) Kombinazzjonijiet li probabbilment ma jokkorru.

47. Skont il-paragrafu 1, jekk is-sustanza tat-test ma tiġix identifikata bħala korrużiva għall-ghajnejn jew irritant sever, għandu jitwettaq aktar ittestjar għall-finijiet ta' klassifikazzjoni u ttikkettar. Il-metodu ta' ttestjar ICE għandu akkuratizza kumplessiva ta' 83 % (120/144) sa 87 % (134/154), rata pożittiva falza ta' 6 % (7/122) sa 8 % (9/116), u rata negattiva falza ta' 41 % (13/32) sa 50 % (15/30) għall-identifikazzjoni ta' sustanzi korrużivi u irritanti severi għall-ghajnejn, meta mqabbel mad-dejta, tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek, ikklassifikata skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-EPA (1), l-UE (2), jew il-GHS (3). Meta sustanzi f'ċerti klassijiet kimiċi (*i.e.*, alkohols u aġenti tensjoattivi) u fiżiċi (*i.e.*, solidi) ikunu esklużi mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-ICE skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS tvarja minn 91 % (75/82) sa 92 % (69/75), ir-rati ta' pożittivi foloz ivarjaw minn 5 % (4/73) sa 6 % (4/70), u r-rati ta' negattivi foloz ivarjaw minn 29 % (2/7) sa 33 % (3/9) (4).
48. Anke jekk għas-sustanza tat-test ma tinkiseb l-ebda klassifikazzjoni ta' sustanza korrużiva jew irritant sever għall-ghajnejn, id-dejta ICE tista' tkun utli, flimkien mad-dejta tat-test *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek jew minn test *in vitro* vvalidat kif xieraq, sabiex jiġu evalwati aktar il-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar ICE kif ukoll kemm dan huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumiex severi u sustanzi li mhumiex irritanti (qed jiġi żviluppat Dokument ta' Gwida dwar l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* fuq l-ghajnejn).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni ta' Studju

49. Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontrolli negattivi jew tal-midjum/solvent konkorrenti u l-kontrolli pożittivi konkorrenti jagħtu Klassifikazzjoni tal-Irritanza simili għal dik li tinsab fil-klassijiet ta' irritanti severi/sustanzi korrużivi, rispettivamente.

Rapport tat-Test

50. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi t-tagħrif li ġej, jekk ikun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll

Isem/ismijiet kimiku/kimiċi pereżempju l-isem strutturali użat mir-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi (CAS), u ismijiet oħra, jekk ikunu magħrufa;

In-Numru tar-Reġistru CAS (RN), jekk ikun magħruf;

Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew it-tahlita (f'percentwal(i) skont il-piż), sakemm dan it-tagħrif ikun disponibbli;

Proprietajiet fiżikokimiċi bħall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

It-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (*eż.*, it-tishin, it-thin);

L-istabilità, jekk tkun magħrufa;

Tagħrif dwar l-Ispenser u l-Istallazzjoni tat-Test

L-isem u l-indirizz tal-isponsor, tal-istallazzjoni tat-test u tad-direttur tal-istudju;

Identifikazzjoni tas-sors tal-ghajnejn (*eż.*, l-istallazzjoni minn fejn ingabru);

Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-ghajnejn (*eż.*, id-data u l-ħin meta ngabru l-ghajnejn, l-intervall tal-ħin qabel ma nbada t-test);

Jekk disponibbli, karatteristiċi speċifiċi tal-annimali minn fejn ingabru l-ghajnejn (*eż.*, età, sess, piż tal-annimal donatur);

Ġustifikazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar u tal-Protokoll Użati

Integrità tal-Metodu ta' Ttestjar

Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (*i.e.*, akkuratizza u affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar tul iż-żmien (*eż.*, ittestjar perjodiku ta' sustanzi ta' profiċjenza, użu ta' dejta storika ta' kontrolli negattivi u pożittivi).

Kriterji għal Test Aċċettabbli

Jekk applikabbli, firxiet aċċettabbli ta' punti ta' riferiment ta' kontroll konkorrenti bbażati fuq dejta storika;

Kundizzjonijiet tat-Test

Deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata;

Mikroskopju tal-kornea użat (eż., il-mudell);

Settings tal-istrument użati għall-mikroskopju tal-kornea;

Tagħrif dwar għajnejn it-tigieġ użati, inklużi dikjarazzjonijiet rigward il-kwalità tagħhom;

Dettagli tal-proċedura tat-test użata;

Konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test użata;

Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

Referenza għad-dejta storika tal-mudell (eż., kontrolli negattivi u pożittivi, sustanzi ta' profiċjenza, sustanzi ta' riferiment);

Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati;

Riżultati

Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

Jekk xieraq, ritratti tal-għajn;

*Diskussjoni tar-Riżultati**Konklużjoni*

LETTERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlittiet, li jemenda u jhassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Disponibbli fuq:

[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. Disponibbli fuq:

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

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

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

- (6) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-Registrazzjoni, il-Valutazzjoni, l-Awtorizzazzjoni u r-Restrizzjoni ta' Sustanzi Kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni. ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Disponibbli fuq:
[\[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html\]](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. Disponibbli fuq:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](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. Disponibbli fuq:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)
- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Disponibbli fuq:
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](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. Disponibbli fuq:
[\[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf\]](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. Disponibbli fuq:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](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. Disponibbli fuq:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-risultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Din hija miżura tar-rendiment tal-metodu ta' ttestjar u aspett wiehed ta' "rilevanza." It-terminu spiss jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza", biex ifisser il-proporzjon ta' risultati pożittivi ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza ta' riferiment: Sustanza użata bħala standard għal paragon ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i), sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii), xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi li jkun qad jiġu ttestjati; (iii), karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv), dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa; u (v), potenza magħrufa fl-iskala tar-reazzjoni mixtieqa

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-ghajn li tkopri l-habba tal-ghajn u l-pupilla u thalli d-dawl jghaddi għal gol-parti interna tal-ghajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' hsara fil-kornea.

Nefha fil-kornea: Kejl oġġettiv fit-test tal-ICE tal-estensjoni tad-distensjoni tal-kornea wara esponiment għas-sustanza tat-test. Din tiġi espressa bħala perċentwal u kkalkulata mill-ewwel kejl (qabel l-iddożar) tal-hxuna tal-kornea u l-hxuna rreġistrata f'intervalli regolari wara esponiment għall-materjal tat-test, fit-test tal-ICE. Id-daqs tan-nefha tal-kornea huwa indikattiv ta' hsara fil-kornea.

Kategorija tal-EPA 1: Korruziv (qerda irriversibbli tat-tessut tal-kornea) jew involviment tal-kornea jew irritazzjoni li tippersisti għal aktar minn 21 jum (1).

Kategorija tal-UE R41: Produzzjoni ta' hsara fit-tessut tal-ghajn, jew thassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajn, li ma jkunx kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (2).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Żamma tal-fluworessxina: Kejl suġġettiv fit-test tal-ICE ta' kemm is-sodju tal-fluworessxina jinżamm miċ-ċelluli tal-epitelju fil-kornea wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. L-ammont ta' fluworessxina li jinżamm huwa indikattiv tal-hsara fl-epitelju tal-kornea.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-haddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (3).

Kategorija tal-GHS 1: Produzzjoni ta' hsara fit-tessut tal-ghajn, jew thassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajn, li ma jkunx kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (3).

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandha l-potenzjal tikkawża effetti avversi meta organizzmu, sistema jew (sub) popolazzjoni jiġi/tiġi espost(a) għal dak l-aġent.

Kontroll negattiv: Replikazzjoni mhux trattata li fiha l-komponenti kollha tas-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza tat-test u kampjuni ta' kontroll ohra sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanzi li mhumiex irritanti: Sustanzi li mhumiex ikklassifikati bhala Kategorija I, II, jew III tal-EPA; Kategorija R41 jew R36 tal-UE; jew Kategorija tal-GHS 1, 2A, jew 2B irritanti tal-ghajnejn (1)(2)(3).

Sustanza korrużiva għall-ghajnejn: (a) Sustanza li tikkawża hsara irriversibbli fl-ghajnejn. (b) Sustanzi li huma kklassifikati bhala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-ghajnejn (1) (2) (3).

Irritant għall-ghajnejn: (a) Sustanza li tipproduċi bidla riversibbli fl-ghajn wara li tiġi applikata fuq is-superficcje anterjuri tal-ghajn; (b) Sustanzi li mhumiex ikklassifikati bhala Kategorija II jew III tal-EPA; Kategorija tal-UE R36; jew Kategorija tal-GHS 2A, jew 2B irritanti tal-ghajnejn (1)(2)(3).

Irritant sever għall-ghajnejn: (a) Sustanza li tikkawża hsara fit-tessut tal-ghajn wara li tiġi applikata fuq is-superficcje anterjuri tal-ghajn u li ma tkunx riversibbli fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża thassir fiżiku serju tal-vista. (b) Sustanzi li huma kklassifikati bhala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-ghajnejn (1) (2) (3).

Kontroll pożittiv: Replikazzjoni li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-reazzjoni severa ma għandux ikun eċċessiv.

Affidabilità: Qies ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettagħ b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettagħ skont l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproducibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u iehor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Mikroskopju tal-kornea (slit-lamp microscope): Strument li jintuża biex l-ghajn tiġi eżaminata b'mod dirett taht l-ingrandiment ta' mikroskopju binokulari billi johloq immaġni dritta u stereoskopika. Fil-metodu ta' ttestjar ICE, dan l-istrument jintuża biex wiehed ikun jista' jara l-istrutturi anterjuri ta' ghajn it-tiġieġa kif ukoll biex ikejjel b'mod oġġettiv il-ħxuna tal-kornea b'apparat li jitwahhal mal-istrument u li jkejjel il-fond.

Kontroll ta' solvent/midjum: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha tas-sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-midjum li jiġi pproċessat mas-sustanza tat-test trattata u kampjuni ta' kontroll ohra sabiex tiġi stabbilita l-ewwel reazzjoni għall-kampjuni ttrattati mis-sustanza tat-test mahlula fl-istess solvent jew midjum. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv konkorenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-midjum ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Ittestjar imtarraġ: Strategija ta' ttestjar pass pass fejn it-tagħrif kollu dwar sustanza tat-test jiġi analizzat f'ordni speċifika, permezz ta' proċess fejn titqies l-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed tagħrif disponibbli għal deċiżjoni ta' klassifikazzjoni ta' periklu, qabel ma wiehed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni jista' jiġi assenjat abbażi ta' tagħrif eżistenti, ma jkun mehtieġ l-ebda ttestjar iehor. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni ma jkunx jista' jiġi assenjat abbażi tat-tagħrif eżistenti proċedura ta' ttestjar sekwenzjali pass pass għandha titwettagħ fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Metodu ta' ttestjar invalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Huwa importanti li wiehed jinnotta li metodu ta' ttestjar invalidat jista' jkun li ma jkollux rendiment tajjeb biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u affidabilità sabiex jinstab aċċettabli għall-ghan propost.

Importanza tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tint-lahaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza li tkun ta' periklu.

Appendiċi 2

SUSTANZI KIMIČI TA' PROFIČJENZA GHALL-METODU TA' TTESTJAR ICE

Qabel l-użu ta' rutina ta' metodu ta' ttestjar li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji jista' jkun li jkunu jixtiequ juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-korrużività għall-ghajnejn ta' 10 sustanzi rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw l-iskala ta' reazzjonijiet ta' irritazzjoni/korrużjoni fl-ghajnejn, li hija bbażata fuq ir-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TG 405) (*i.e.*, il-Kategoriji 1, 2A, 2B, jew Mhux Ikklassifikata jew Ittikketata skont il-GHS tan-NU) (3)(7). Madankollu, meta jitiqies kemm dawn l-assaġġi huma utli b'mod li huwa vvalidat (*i.e.*, biex jiġu identifikati sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-ghajnejn), hemm biss żewġ riżultati għall-finijiet ta' klassifikazzjoni (sustanza korrużiva/irritant sever jew sustanza mhux korrużiva/irritant mhux sever) biex tintwera l-profiċjenza. Kriterji oħra tal-għażla kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli b'mod kummerċjali, ikun hemm disponibbli dejta ta' referenzi ta' kwalità għolja *in vivo*, u li jkun hemm dejta ta' kwalità għolja miż-żewġ metodi *in vitro* li għalihom qegħdin jiġu żviluppati l-Linji Gwida għall-Ittestjar. Għal din ir-raġuni, sustanzi irritanti ntgħażlu mil-lista rrakkomandata mill-ICCVAM ta' 122 sustanza ta' referenza għall-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar ta' tossiċità għall-ghajnejn *in vitro* (ara l-Appendiċi H, Lista ta' Sustanzi ta' Referenza Rrakkomandati mill-ICCVAM)(4). Id-dejta tar-referenzi hija disponibbli fid-Dokumenti ta' Analizi tal-Isfond tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Opacità u tal-Permeabilità tal-Kornea tal-Bovini (BCOP) u l-ICE (18) (19).

Tabella 1

Sustanzi rrakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika mal-ICE

Sustanza kimika	CASRN	Klassi Kimika ⁽¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni <i>In Vivo</i> ⁽²⁾	Klassifikazzjoni <i>In Vitro</i> ⁽³⁾
Klorur tal-benzal-konju (5 %)	8001-54-5	Kompost ta' onju	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Aċidu dibenzojl-L-tartariku	2743-38-6	Aċidu karbos-siliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Imidażol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Aċidu trikloroaċetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
2,6-diklorobenz-ojl klorur	4659-45-4	Alid aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Etil-2-metil-aċeto-aċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2B	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Gliċerol	56-81-5	Alkohol	Likwidu	Mhux tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
n-essan	110-54-3	Idrokarbonju (aċiliku)	Likwidu	Mhux tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever

Taqisriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqisriet tas-Sustanzi Kimiċi

⁽¹⁾ Klassijiet kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, abbażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-librerija nazzjonali tal-intestaturi tas-sugġetti mediċi tal-mediċina (MeSH) (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

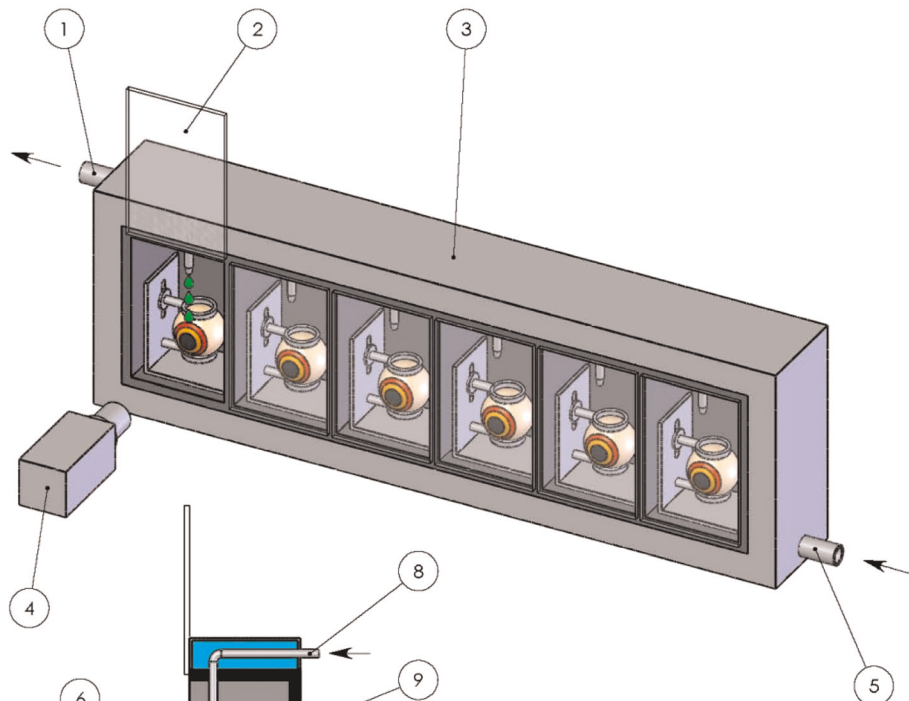
⁽²⁾ Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU (3)(7).

⁽³⁾ Abbażi tar-riżultati fil-BCOP u l-ICE.

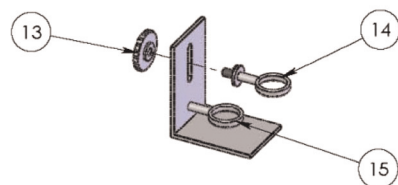
Appendiċi 3

Dijagrammi tal-apparat tas-superfużjoni ICE u l-klampi tal-ghajnejn

(Ara Burton et al. (17) għal deskrizzjonijiet ġeneriċi addizzjonali tal-apparat tas-superfużjoni u l-klampi tal-ghajnejn)



KOMPARTIMENT FTAQSIMA TRASVERSALI



APPARAT FEJN TITQIEGHED L-GHAJN

NRU TAL-OĠĠETT	DESKRIZZJONI
1	ŻBOKK GHALL-ILMA SHUN
2	BIEBA TIŻŻERŻAQ
3	APPARAT TAS-SUPERFUŻJONI
4	STRUMENT GHAT-TKEJJIL OTTIKU
5	FTUH GHAD-DHUL TAL-ILMA SHUN
6	SOLUZZJONI TA' ILMA BIL-MELH
7	ILMA SHUN
8	FTUH GHAD-DHUL TAL-ILMA BIL-MELH
9	KOMPARTIMENT
10	APPARAT FEJN TITQIEGHED L-GHAJN
11	GHAJN TA' TIĠIEĠA
12	ŻBOKK GHALL-ILMA BIL-MELH
13	VIT LI JIFFISSA FIL-POST
14	ID TA' FUQ AĠĠUSTABBLI
15	ID TA' ISFEL FISSA"