

## VERORDENING (EU) Nr. 1152/2010 VAN DE COMMISSIE

van 8 december 2010

tot wijziging, in verband met de aanpassing ervan aan de technische vooruitgang, van Verordening (EG) nr. 440/2008 houdende vaststelling van testmethoden uit hoofde van Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH)

(Voor de EER relevante tekst)

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gelet op het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gelet op Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie<sup>(1)</sup>, en met name op artikel 13, lid 3,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) Verordening (EG) nr. 440/2008 van de Commissie<sup>(2)</sup> bevat de testmethoden voor de bepaling van de fysisch-chemische eigenschappen, de toxiciteit en de ecotoxiciteit van stoffen die worden toegepast voor de uitvoering van Verordening (EG) nr. 1907/2006.
- (2) Verordening (EG) nr. 440/2008 dient te worden bijgewerkt om daarin met prioriteit twee nieuwe, recentelijk door de OESO goedgekeurde *in-vitro* testmethoden voor oogirritatie op te nemen teneinde overeenkomstig Richt-

lijn 86/609/EEG van de Raad van 24 november 1986 inzake de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de lidstaten betreffende de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt<sup>(3)</sup>, tot een verlaging van het aantal proefdieren te komen. De belanghebbenden zijn over dit voorstel geraadpleegd.

- (3) Verordening (EG) nr. 440/2008 moet dan ook dienovereenkomstig worden gewijzigd.
- (4) De bepalingen van deze verordening zijn in overeenstemming met het advies van het bij artikel 133 van Verordening (EG) nr. 1907/2006 ingestelde comité,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

*Artikel 1*

Aan deel B van de bijlage van Verordening (EG) nr. 440/2008 worden de hoofdstukken B.47 en B.48 toegevoegd overeenkomstig de bijlage bij deze verordening.

*Artikel 2*

Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 8 december 2010.

Voor de Commissie

De voorzitter

José Manuel BARROSO

<sup>(1)</sup> PB L 396 van 30.12.2006, blz. 1.

<sup>(2)</sup> PB L 142 van 31.5.2008, blz. 1.

<sup>(3)</sup> PB L 358 van 18.12.1986, blz. 1.

## BIJLAGE

**„B.47 BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY (BCOP-) TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN VOOR DE OGEN CORROSIEVE EN HEVIG IRRITERENDE STOFFEN**

## INLEIDING

1. De BCOP-testmethode is een *in-vitro* testmethode die, onder bepaalde omstandigheden en met bepaalde beperkingen, kan worden gebruikt om stoffen en mengsels in te delen als „voor de ogen corrosief en hevig irriterend” (1) (2) (3). Voor het doel van deze testmethode worden hevig irriterende stoffen gedefinieerd als stoffen die bij konijnen oogletsels veroorzaken die minstens 21 dagen na de aanbrenging voortduren. Hoewel BCOP niet als een volwaardige vervanger voor de *in-vivo*-oogtest bij konijnen wordt beschouwd, wordt deze methode toch aangeraden als onderdeel van een trapsgewijze teststrategie voor de indeling en etikettering volgens de regelgeving binnen een bepaald toepassingsgebied (4) (5). Teststoffen en -mengsels (6) kunnen worden ingedeeld als voor de ogen corrosieve of hevig irriterende stoffen zonder bijkomende testen op konijnen. Een stof die negatief test, dient op konijnen te worden getest met een sequentiële teststrategie zoals uiteengezet in de technische richtsnoeren van de OESO (OECD Test Guidelines 405 (7) - zie hoofdstuk B.5 van deze bijlage).
2. Het doel van deze testmethode is het beschrijven van de procedures die worden gebruikt om de mogelijke corrosie of hevige irritatie van een teststof voor de ogen te beoordelen aan de hand van het vermogen van deze stof om troebelheid en verhoogde permeabiliteit in een afgezonderde bovine cornea te veroorzaken. Toxische effecten op de cornea worden als volgt gemeten: (i) verminderde lichttransmissie (troebelheid) en (ii) verhoogde doorlating van natriumfluoresceïne (permeabiliteit). De beoordelingen van de troebelheid en permeabiliteit van de cornea na blootstelling aan een teststof worden samengevoegd om een *in-vitro*-irritatiescore (IVIS) af te leiden die gebruikt wordt om het irritatieniveau van de teststof te bepalen.
3. Voor de ogen irriterende stoffen die letsels veroorzaken die in minder dan 21 dagen verdwijnen en stoffen die niet-irriterend zijn, werden ook getest met de BCOP-testmethode. De nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de BCOP-testmethode voor stoffen van deze klassen werden echter nog niet formeel beoordeeld.
4. Definities worden gegeven in bijlage 1.

## TOELICHTING EN BEPERKINGEN

5. Deze testmethode is gebaseerd op het protocol van de BCOP-testmethode van het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (8) dat ontwikkeld werd naar aanleiding van een internationale valideringsstudie (4)(5)(9) met bijdragen van het European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) en het Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM). Het protocol is gebaseerd op van het Institute for In Vitro Sciences (IIVS) en INVITTOX Protocol 124 (10) verkregen informatie die het door de Europese Gemeenschap gesteunde protocol vertegenwoordigt dat gebruikt werd voor het prevalideringsonderzoek van het in 1997-1998 gevoerde BCOP-onderzoek. Beide protocollen zijn gebaseerd op de BCOP-onderzoeksmethodologie die voor het eerst werd beschreven door Gautheron *et al.* (11).
6. De geïdentificeerde beperkingen van deze testmethode zijn gebaseerd op het grote aantal vals-positieve resultaten voor alcoholen en ketonen en het grote aantal vals-negatieve resultaten voor vaste stoffen die werden waargenomen in de valideringsgegevensbank (zie paragraaf 44) (5). De nauwkeurigheid van BCOP in het EU-, EPA- en GHS-classificatiesysteem verbetert aanzienlijk als stoffen die tot deze chemische en fysische klassen behoren uit de gegevensbank worden verwijderd (5). Op basis van het doel van dit onderzoek (d.w.z. het identificeren van enkel stoffen die corrosie/hevige irritatie aan de ogen veroorzaken) zijn vals-negatieve resultaten niet doorslaggevend aangezien deze stoffen nadien op konijnen of met andere gevalideerde *in-vitro* testen, afhankelijk van de geldende voorschriften, worden getest met behulp van een sequentiële teststrategie in een benadering met meervoudige bewijsvoering („weight of evidence” benadering). Bovendien liet de huidige valideringsgegevensbank geen ruimte voor een adequate beoordeling van sommige chemische producten of productklassen (bv. mengsels). Onderzoekers kunnen echter overwegen deze testmethode te gebruiken voor alle soorten testmateriaal (met inbegrip van mengsels) waarbij een positief resultaat kan worden aangenomen als een aanwijzing van een voor de ogen corrosieve of hevig irriterende respons. Positieve resultaten die verkregen werden met alcoholen of ketonen dienen echter met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd omwille van het risico voor overpredictie.
7. Alle procedures met bovine ogen en cornea dienen de op de testinrichting toepasselijke regelgeving en procedures voor de behandeling van van dieren afkomstig materiaal na te leven, met inbegrip van maar niet beperkt tot weefsels en weefselvloeistoffen. Universele voorzorgsmaatregelen voor laboratoria zijn aanbevolen (12).
8. Een beperking van de testmethode is dat deze methode weliswaar rekening houdt met sommige in de oogirritatie-testmethode bij het konijn waargenomen effecten op het oog en in bepaalde mate met hun ernst, maar dat ze geen rekening houdt met letsels van het ooglid en de iris. Hoewel de reversibiliteit van hoornvliesletsels op zichzelf niet kan worden beoordeeld in het BCOP-onderzoek, werd eveneens voorgesteld, op basis van studies op de ogen van konijnen, dat een beoordeling van de aanvankelijke diepte van het hoornvliesletsel kan worden gebruikt om een onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele effecten (13). Tot slot kan de potentiële systemische toxiciteit die gepaard gaat met de blootstelling van het oog, met de BCOP-methode niet beoordeeld worden.

9. Er worden inspanningen geleverd om het nut en de beperkingen van het BCOP-onderzoek voor de identificatie van niet-hevig irriterende stoffen en niet-irriterende stoffen (zie ook paragraaf 45) verder te typeren. Gebruikers worden eveneens aangemoedigd om monsters en/of gegevens te leveren aan valideringsorganisaties voor een formele beoordeling van mogelijk toekomstig gebruik van de BCOP-testmethode, met inbegrip van de identificatie van niet-hevig irriterende stoffen en niet-irriterende stoffen.
10. Elk laboratorium dat dit onderzoek voor het eerst opstelt, dient gebruik te maken van de in bijlage 2 voorziene chemicaliën voor bekwaamheidstoetsing. Een laboratorium kan deze chemicaliën gebruiken om zijn technische bekwaamheden met betrekking tot het uitvoeren van de BCOP-testmethode aan te tonen vooraleer het BCOP-onderzoeksgegevens indient voor de wettelijke gevarenclassificatie.

#### PRINCIPE VAN DE TEST

11. De BCOP-testmethode is een organotypisch model dat handhaving op korte termijn van de normale fysiologische en biochemische werking van bovine cornea *in vitro* vereist. In deze testmethode wordt schade door de teststof beoordeeld door kwantitatieve metingen van de wijzigingen in de troebelheid en permeabiliteit van de cornea door gebruik van een opacitometer, respectievelijk een VIS-spectrofotometer. Beide metingen worden gebruikt om een IVIS te berekenen die gebruikt wordt om een *in-vitro*-irritatiegevaclassificatie toe te kennen voor de voorspelling van mogelijke *in-vivo*-oogirritatie van een teststof (zie beslissingscriteria).
12. De BCOP-testmethode gebruikt afgezonderde cornea's van de ogen van pas geslacht vee. De troebelheid van cornea's wordt kwantitatief gemeten als de hoeveelheid lichttransmissie door de cornea. De permeabiliteit wordt kwantitatief gemeten als de hoeveelheid natriumfluoresceïne die door de volledige dikte van de cornea passeert, wat gemeten wordt in het medium dat zich bevindt in de achterkamer. Teststoffen worden aangebracht op de epitheel laag van de cornea door toevoeging aan de voorkamer van de corneahouder. Bijlage 3 geeft een beschrijving en een diagram van een corneahouder die wordt gebruikt in de BCOP. Corneahouders zijn verkrijgbaar in de handel of kunnen zelf worden gemaakt.

#### Bron en ouderdom van runderogen en selectie van diersoorten

13. Vee dat naar de slachterij wordt gebracht, wordt meestal geslacht ofwel voor menselijke consumptie ofwel voor ander commercieel gebruik. Voor gebruik in BCOP worden enkel de cornea's van gezonde dieren die geschikt worden geacht voor de menselijke voedselketen in aanmerking genomen. Aangezien vee een grote verscheidenheid aan gewicht vertoont, afhankelijk van ras, leeftijd en geslacht, is er geen aanbevolen gewicht van het dier op het ogenblik van de slachting.
14. De afmetingen van de cornea's kunnen variëren als gevolg van het gebruik van de ogen van dieren van verschillende leeftijdscategorieën. Cornea's met een horizontale diameter van  $> 30,5$  mm en een centrale corneale dikte (CCT)  $\geq 1100$   $\mu\text{m}$  zijn meestal afkomstig van vee dat ouder is dan acht jaar terwijl cornea's met een horizontale diameter van  $< 28,5$  mm en een CCT  $< 900$   $\mu\text{m}$  meestal afkomstig zijn van vee dat jonger is dan vijf jaar (14). Om die reden worden doorgaans geen ogen gebruikt van vee dat ouder is dan 60 maanden. Ogen van vee jonger dan 12 maanden worden doorgaans niet gebruikt aangezien de ogen dan nog niet volgroeid zijn en de corneale dikte en diameter aanzienlijk kleiner zijn dan deze opgetekend voor ogen van volwassen vee. Het gebruik van cornea's van jonge dieren (d.w.z. 6 tot 12 maanden oud) is toegestaan aangezien hieraan voordelen verbonden zijn zoals grotere beschikbaarheid, een nauwe leeftijdsgroep en minder gevaar met betrekking tot de blootstelling van werknemers aan bovine spongiforme encefalopathie (15). Aangezien nadere evaluatie van het effect van corneale grootte of dikte op de responsiviteit op corrosieve en irriterende stoffen nuttig kan zijn, worden gebruikers aangemoedigd om de geschatte leeftijd en/of het gewicht van de dieren waarvan de cornea's in onderzoek worden gebruikt, te rapporteren.

#### Verzameling en vervoer van ogen naar het laboratorium

15. De ogen worden verzameld door werknemers van de slachterij. Om mechanische en andere vormen van oogschade te minimaliseren, dienen de ogen na de dood zo spoedig mogelijk verwijderd te worden. Om blootstelling van de ogen aan mogelijk irriterende stoffen te voorkomen, mogen de werknemers van de slachterij geen detergent gebruiken bij het afspoelen van de kop van het dier.
16. De ogen dienen onmiddellijk te worden ondergedompeld in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) in een houder van aangepaste grootte en naar het laboratorium te worden vervoerd op een wijze die bederf en/of bacteriële contaminatie minimaliseert. Omdat de ogen worden verzameld tijdens het slachtproces, is het mogelijk dat ze blootgesteld worden aan bloed en andere biologische stoffen zoals bacteriën en andere micro-organismen. Om die reden dient te worden verzekerd dat het risico op besmetting zo klein mogelijk is (bv. door de houder met de ogen op nat ijs te plaatsen, door antibiotica toe te voegen aan de HBSS die gebruikt wordt om de ogen tijdens het vervoer te bewaren [bv. penicilline aan 100 IU/ml en streptomycine aan 100  $\mu\text{g/ml}$ ]).
17. Het tijdsinterval tussen de verzameling van de ogen en het gebruik van de cornea's in de BCOP dient te worden beperkt tot een minimum (gewoonlijk verzameling en gebruik dezelfde dag) en mag de onderzoeksresultaten niet in gevaar brengen. Deze resultaten zijn gebaseerd op de selectiecriteria voor de ogen alsook op de positieve en negatieve controleresponsen. Alle in het onderzoek gebruikte ogen dienen van dezelfde groep op een bepaalde dag verzamelde ogen te zijn.

**Selectiecriteria voor in de BCOP-test gebruikte ogen**

18. In het laboratorium aangekomen, worden de ogen zorgvuldig onderzocht voor gebreken zoals verhoogde troebelheid, krassen en neovascularisatie. Enkel cornea's zonder deze gebreken mogen worden gebruikt.
19. De kwaliteit van elke cornea wordt ook op latere tijdstippen van het onderzoek beoordeeld. Cornea's met een troebelheid van meer dan zeven eenheden (OPMERKING: de opacitometer dient te worden geijkt met troebelheidsnormen die worden gebruikt voor de vaststelling van de troebelheidseenheden, zie bijlage 3) na een initiële evenwichtsperiode van een uur, dienen te worden weggegooid.
20. Elke behandelingsgroep (teststof, tegelijkertijd gemeten negatieve en positieve controles) bevat minstens drie ogen. Drie cornea's dienen te worden gebruikt voor de negatieve controle in het BCOP-onderzoek. Aangezien alle cornea's uit de oogbol worden verwijderd en in de corneale kamers worden geplaatst, bestaat het risico voor artefacten door de behandeling van de individuele corneale troebelheids- en permeabiliteitswaarden (met inbegrip van de negatieve controle). Bovendien worden de troebelheids- en permeabiliteitswaarden van de cornea's van de negatieve controle gebruikt om de troebelheids- en permeabiliteitswaarden van het testartikel en de cornea's van de positieve controle in de IVIS-berekeningen te corrigeren.

**PROCEDURE****Vorbereiding van de ogen**

21. Cornea's zonder gebreken worden voorzichtig losgemaakt van de harde oogrok met een rand van 2 tot 3 mm, die nodig zal zijn voor de opeenvolgende handelingen, zodat geen schade ontstaat aan het corneale epitheel en endotheel. De afzonderlijke cornea's worden in een speciaal ontworpen corneahouder geplaatst die bestaat uit een voorkamer en een achterkamer die de epitheellaag, respectievelijk de endotheellaag van de cornea raken. Beide kamers zijn overvloedig gevuld met voorverwarmde Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (eerst de achterkamer) om de vorming van bellen te voorkomen. Het apparaat wordt dan geëquilibreerd op  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  voor een periode van minstens één uur om de cornea's met het medium te laten equilibreren en een normale metabolische activiteit te bereiken voor zover mogelijk (de temperatuur van het hoornvliesoppervlak *in vivo* is ongeveer  $32^\circ\text{C}$ ).
22. Na het equilibreren wordt nieuwe voorverwarmde EMEM toegevoegd aan beide kamers en referentietroebelheidswaarden worden gemeten in elke cornea. Cornea's die macroscopische weefselschade (bv. krassen, pigmentatie, neovascularisatie) of een troebelheid  $> 7$  eenheden vertonen, worden verwijderd. De gemiddelde troebelheid van alle geëquilibreerde cornea's wordt berekend. Minstens drie cornea's met troebelheidswaarden rond de mediaan voor alle cornea's worden geselecteerd als cornea's voor negatieve (of oplosmiddel-) controle. De resterende cornea's worden dan onderverdeeld in een behandelings- en een positieve-controlegroep.
23. Aangezien de warmtecapaciteit van water groter is dan die van lucht, geeft water stabielere temperaturomstandigheden voor incubatie. Om die reden wordt het gebruik van een waterbad aanbevolen om de temperatuur van de corneahouder met inhoud op  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  te houden. Luchtincubators kunnen echter ook worden gebruikt met de nodige voorzorgsmaatregelen voor behoud van de temperatuurstabiliteit (bv. door voorverwarming van de houders en media).

**Aanbrengen van de teststof**

24. Twee verschillende behandelingsprotocollen worden gebruikt, één voor vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen (vaste stoffen en vloeistoffen), en één voor niet-oppervlakteactieve vaste stoffen.
25. Vloeistoffen worden onverdund getest. Oppervlakteactieve stoffen worden getest met een concentratie van 10 % g/v in een oplossing van 0,9 % natriumchloride, gedistilleerd water of een ander oplosmiddel waarvan geweten is dat het geen nadelig effect heeft op het testsysteem. Halfvaste stoffen, pasta's en was worden getest op dezelfde wijze als vloeistoffen. Alternatieve verdunningen dienen te worden gemotiveerd. Cornea's worden blootgesteld aan vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen voor een periode van 10 minuten. Andere blootstellingsperioden dienen op adequate wetenschappelijke manier te worden gemotiveerd.
26. Niet-oppervlakteactieve stoffen worden gewoonlijk getest als oplossingen of suspensies met een concentratie van 20 % in een oplossing van 0,9 % natriumchloride, gedistilleerd water of een ander oplosmiddel waarvan geweten is dat het geen nadelig effect heeft op het testsysteem. In bepaalde omstandigheden en met de juiste wetenschappelijke verklaring, kunnen vaste stoffen ook zuiver getest worden door rechtstreekse aanbrenging op het cornea-oppervlak aan de hand van de open-kamer methode (zie paragraaf 29). Cornea's worden blootgesteld aan vaste stoffen voor een periode van vier uur maar, zoals bij vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen, kunnen alternatieve blootstellingsperioden gebruikt worden met de juiste wetenschappelijke motivering.
27. Verschillende behandelingsmethoden kunnen worden gebruikt afhankelijk van de fysische aard en chemische kenmerken (bv. vaste stoffen, vloeistoffen, viskeuze of niet-viskeuze vloeistoffen) van de teststof. Essentieel is dat de teststof de hele epitheellaag bedekt en dat deze stof voldoende wordt verwijderd tijdens het uitwassen. Een gesloten-kamer methode wordt gewoonlijk gebruikt voor niet-viskeuze tot licht-viskeuze vloeibare teststoffen, terwijl een open-kamer methode gewoonlijk wordt gebruikt voor semi-viskeuze en viskeuze vloeibare teststoffen en voor zuiver vaste stoffen.

28. In de gesloten-kamer methode wordt voldoende teststof (750 µL) om de epitheelzijde van de cornea te bedekken, ingebracht in de voorkamer via de doseergaten aan de bovenzijde van de kamer waarna de gaten tijdens de blootstelling met kamersoppen worden verzegeld. Het is belangrijk na te gaan dat elke cornea gedurende het juiste tijdsinterval is blootgesteld aan een teststof.
29. In de open-kamer methode worden de afsluiting van het glas en het glas van de voorkamer verwijderd voor de behandeling. De controle- of teststof (750 µL of voldoende teststof om de cornea volledig te bedekken) wordt rechtstreeks op de epitheel laag van de cornea aangebracht met een micropipet. Als de teststof moeilijk te pipetteren is, kan de teststof onder druk worden geladen in een plunjerpipet om de dosering te vergemakkelijken. De pipetpunt van de plunjerpipet wordt ingebracht in de verdeelpunt van de spuit zodat het materiaal onder druk kan worden opgeladen in de verdeelpunt. Gelijktijdig worden de spuitplunjer ingedrukt en de pipetzuiger opgetrokken. Als er zich luchtballen vormen in de pipetpunt, dan wordt het testartikel verwijderd (uitgedreven) en het proces herhaald tot de punt gevuld is zonder luchtballen. Indien nodig, kan een gewone spuit (zonder naald) worden gebruikt aangezien hiermee een nauwkeurige hoeveelheid teststof kan worden gemeten en de teststof gemakkelijk op de epitheel laag van de cornea kan worden aangebracht. Na de dosering wordt het glas van de voorkamer teruggeplaatst om opnieuw een gesloten systeem te creëren.

### **Incubatie na blootstelling**

30. Na de blootstellingsperiode worden de teststof, de negatieve-controle- of positieve-controlestof verwijderd uit de voorkamer en wordt het epitheel ten minste drie keer (of tot geen spoor van de teststof meer kan worden waargenomen) gewassen met EMEM (dat fenolrood bevat). Een medium dat fenolrood bevat, wordt voor het uitwassen gebruikt aangezien verkleuring van het fenolrood kan worden gecontroleerd om de doeltreffendheid van het uitwassen van zuurrijke of alkalische materialen te bepalen. De cornea's worden meer dan drie keer gewassen als het fenolrood nog steeds verkleurt (geel of purper) of als er nog teststof zichtbaar is. Zodra het medium vrij is van teststof, krijgen de cornea's een laatste uitwassing met EMEM (zonder fenolrood). EMEM (zonder fenolrood) wordt gebruikt als laatste uitwassing om te verzekeren dat alle fenolrood uit de voorkamer is verwijderd voordat de troebelheid wordt gemeten. De voorkamer wordt dan gevuld met nieuwe EMEM zonder fenolrood.
31. Voor vloeistoffen of oppervlakteactieve stoffen worden de cornea's eerst uitgewassen en vervolgens geïncubeerd op  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  voor een bijkomende periode van twee uur. Langere post-blootstellingstijd kan nuttig zijn in bepaalde omstandigheden en kan geval per geval worden beschouwd. Met vaste stoffen behandelde cornea's worden grondig uitgewassen na een blootstelling van vier uur maar hebben geen bijkomende incubatietijd nodig.
32. Aan het einde van de incubatietijd na blootstelling voor vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen en aan het einde van vier uur blootstelling voor niet-oppervlakteactieve vaste stoffen, worden de troebelheid en permeabiliteit van elke cornea opgetekend. Elke cornea wordt eveneens visueel geobserveerd en relevante waarnemingen worden opgetekend (bv. loskomend weefsel, overblijvende teststof, niet-uniforme troebelheidspatronen). Deze waarnemingen kunnen belangrijk zijn aangezien ze kunnen worden weerspiegeld door variaties in de metingen van de opacitometer.

### **Controlestoffen**

33. In elk experiment worden gelijktijdig negatieve controles of controles met oplosmiddel/medium en positieve controles uitgevoerd.
34. Bij het testen van een vloeistof aan 100 %, wordt een gelijktijdige negatieve controle (d.w.z. 0,9 % natriumchloride-oplossing of gedistilleerd water) in de BCOP-testmethode opgenomen zodat niet-specifieke wijzigingen in het test-systeem kunnen worden opgespoord; dit levert tevens een referentiekader voor de eindpunten van het onderzoek. Het verzekert ook dat de omstandigheden van het onderzoek niet op ongepaste wijze leiden tot een irriterende respons.
35. Bij het testen van een verdunde vloeistof, oppervlakteactieve stof of vaste stof, wordt gelijktijdig een controlegroep met een oplosmiddel/medium in de BCOP-testmethode opgenomen zodat niet-specifieke wijzigingen in het test-systeem kunnen worden opgespoord; dit levert tevens een referentiekader voor de eindpunten van het onderzoek. Er kunnen enkel oplosmiddelen/media worden gebruikt waarvan geweten is dat ze geen nadelig effect op het test-systeem hebben.
36. Een bekende voor de ogen irriterende stof wordt opgenomen in elk experiment als gelijktijdige positieve controle om na te gaan of de juiste respons wordt opgewekt. Aangezien het BCOP-onderzoek in deze testmethode wordt gebruikt om corrosieve en hevig irriterende stoffen te identificeren, is het best dat de positieve controle gebeurt met een stof die een hevige respons opwekt in deze testmethode. Om te verzekeren dat de variabiliteit in de positieve-controterespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van irriterende respons niet buitensporig zijn.
37. Voorbeelden van positieve controles voor vloeibare teststoffen zijn dimethylformamide of 1 % natriumhydroxide. Een voorbeeld van een positieve controle voor vaste teststoffen is 20 % (gewicht/volume) imidazool in 0,9 % natriumchlorideoplossing.



38. IJkstoffen zijn nuttig voor de beoordeling van potentiële oogirritatie bij onbekende chemicaliën uit een specifieke chemische klasse of productklasse, of voor de beoordeling van potentiële relatieve irritatie van een voor het oog irriterende stof binnen een reeks van irritatiereponsen.

#### Gemeten eindpunten

39. De troebelheid wordt gemeten door de hoeveelheid lichttransmissie door de cornea. De corneale troebelheid wordt kwantitatief gemeten met behulp van een opacitometer. De resultaten zijn troebelheidswaarden op een continue schaal.
40. De permeabiliteit wordt bepaald door de hoeveelheid natriumfluoresceïne die alle corneale cellagen penetreert (d.w.z. van de epitheel laag aan het buitenste corneale oppervlak tot de endotheellaag aan de binnenkant). 1 ml natriumfluoresceïneoplossing (4 of 5 mg/ml voor vloeistoffen en oppervlakreactieve stoffen respectievelijk niet-oppervlakreactieve vaste stoffen) wordt toegevoegd aan de voorkamer van de corneahouder, die in verbinding staat met de epitheelzijde van de cornea, terwijl de achterkamer, die in verbinding staat met de endotheelzijde van de cornea, gevuld is met nieuwe EMEM. De houder wordt dan gedurende  $90 \pm 5$  min op  $32 \pm 1$  °C geïncubeerd in een horizontale positie. De hoeveelheid natriumfluoresceïne die doordringt naar de achterkamer wordt kwantitatief gemeten met behulp van UV/VIS-spectrofotometrie. Op 490 nm beoordeelde spectrofotometrische metingen worden opgetekend als optische dichtheid ( $OD_{490}$ ) of absorptiewaarden, die gemeten worden op een continue schaal. De permeabiliteitswaarden van fluoresceïne worden bepaald aan de hand van de  $OD_{490}$ -waarden op basis van een VIS-spectrofotometer met een standaardweglengte van 1 cm.
41. Ook kan een 96-wells-microtiterplaatlezer gebruikt worden op voorwaarde dat (i) het lineaire bereik van de plaatlezer voor de vaststelling van fluoresceïne  $OD_{490}$ -waarden kan worden vastgesteld; en (ii) de juiste hoeveelheid fluoresceïne monsters in de 96-wells-plaat wordt gebruikt om  $OD_{490}$ -waarden te verkrijgen die gelijk zijn aan een standaardweglengte van 1 cm (hiervoor kan een volledige well noodzakelijk zijn [meestal 360mL]).

#### GEGEVENS EN RAPPORTAGE

##### Evaluatie van de gegevens

42. Zodra de troebelheids- en gemiddelde permeabiliteits- ( $OD_{490}$ ) waarden gecorrigeerd zijn voor achtergrondtroebelheid en de permeabiliteits- $OD_{490}$ -waarden van de negatieve controle, dienen de gemiddelde troebelheids- en permeabiliteits- $OD_{490}$ -waarden voor elke behandelingsgroep als volgt samengevoegd te worden in een empirisch afgeleide formule om voor elke behandelingsgroep een *in-vitro*-irritatiescore (IVIS) te berekenen:

$$IVIS = \text{gemiddelde troebelheidswaarde} + (15 \times \text{gemiddelde permeabiliteits-}OD_{490}\text{-waarde})$$

Sina *et al.* (16) schreef dat deze formule afgeleid was tijdens onderzoeken in eigen laboratorium en interlaboratoriumonderzoeken. De gegevens die gegenereerd werden voor een reeks van 36 verbindingen in een multilaboratoriumonderzoek werden onderworpen aan een multivariate analyse om de best passende verhouding tussen *in-vivo*- en *in-vitro* gegevens te bepalen. Deze analyse werd uitgevoerd door wetenschappers van twee verschillende bedrijven die op ongeveer identieke verhoudingen uitkwamen.

43. De troebelheids- en permeabiliteitswaarden dienen ook onafhankelijk van elkaar beoordeeld te worden om te bepalen of een teststof corrosiviteit of hevige irritatie opwekt via slechts een van de twee eindpunten (zie beslissingscriteria).

##### Beslissingscriteria

44. Een stof die een IVIS  $\geq 55,1$  opwekt, wordt gedefinieerd als een corrosieve of hevig irriterende stof. Zoals reeds in paragraaf 1 vermeld, dienen bijkomende testen te worden uitgevoerd om deze stof te kunnen indelen en etiketteren, indien de teststof niet geïdentificeerd werd als corrosief of hevig irriterend voor de ogen. De BCOP-testmethode heeft een algemene nauwkeurigheidsgraad van 79 % (113/143) tot 81 % (119/147), een percentage vals-positieve uitslagen van 19 % (20/103) tot 21 % (22/103) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 16 % (7/43) tot 25 % (10/40) in vergelijking met de gegevens van de *in-vivotest* methode op konijnenogen die ingedeeld zijn volgens de EPA- (1), EU- (2) of GHS- (3) classificatiesystemen. Als stoffen binnen bepaalde chemische klassen (d.w.z. alcoholen, ketonen) of fysische klassen (d.w.z. vaste stoffen) uit de gegevensbank gesloten worden, dan varieert de nauwkeurigheid van BCOP tussen de EU-, EPA- en GHS-classificatiesystemen van 87 % (72/83) tot 92 % (78/85), het percentage vals-positieve uitslagen van 12 % (7/58) tot 16 % (9/56) en het percentage vals-negatieve uitslagen van 0 % (0/27) tot 12 % (3/26).
45. Zelfs indien een teststof geen classificatie als voor de ogen corrosief en hevig irriterend verkrijgt, dan nog kunnen BCOP-gegevens nuttig zijn in combinatie met testgegevens van de *in-vivotest* op konijnenogen of van een degelijk gevalideerde *in-vitro* test voor verdergaande beoordeling van het nut en de beperkingen van de BCOP-testmethode voor de identificatie van niet-hevig irriterende en niet-irriterende stoffen (een richtsnoer over het gebruik van *in-vitro* toxiciteitstestmethoden op ogen is in voorbereiding).

**Acceptatiecriteria van het onderzoek**

46. Een test wordt als aanvaardbaar beschouwd als de positieve controle een IVIS oplevert die tussen twee standaardafwijkingen van het huidige historische gemiddelde valt, dat minstens om de drie maanden wordt bijgewerkt of telkens als een aanvaardbare test wordt uitgevoerd in laboratoria waar op onregelmatige basis testen worden uitgevoerd (d.w.z. minder dan een keer per maand). De negatieve-controterespons of controterespons met oplosmiddel/medium dient te resulteren in troebelheids- en permeabiliteitswaarden die lager zijn dan de vastgestelde bovengrenswaarden voor achtergrondtroebelheid en permeabiliteit voor bovine cornea's die werden gebruikt voor de negatieve controle respectievelijk oplosmiddel/mediumcontrole.

**Testverslag**

47. Het testverslag dient de volgende informatie te bevatten, indien relevant voor het voeren van het onderzoek:

*Test- en controlestoffen*

Chemische benaming(en) zoals de gestructureerde benaming gebruikt door de Chemical Abstracts Service (CAS), gevolgd door andere benamingen indien bekend.

Het CAS-registratienummer (RN), indien bekend.

Zuiverheid en samenstelling van de stof of het mengsel (in percentage(s) per gewicht) voor zover deze informatie beschikbaar is.

Fysisch-chemische eigenschappen zoals de fysische staat, vluchtigheid, pH, stabiliteit, scheikundige klasse, oplosbaarheid in water, die van belang zijn voor het voeren van het onderzoek.

Behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen).

Stabiliteit, indien bekend.

*Informatie met betrekking tot de opdrachtgever en de testinstallatie*

Naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de directeur van het onderzoek.

Identificatie van de herkomst van de ogen (d.w.z. de plaats waar ze verzameld werden).

Opslag- en transportomstandigheden van de ogen (bv. datum en tijdstip van de verzameling, tijdsinterval tot aan de aanvang van de testen, transportmedia en temperaturomstandigheden, eventueel gebruikte antibiotica).

Indien beschikbaar, specifieke kenmerken van de dieren waarvan de ogen werden verzameld (bv. leeftijd, geslacht, gewicht van het donordier).

*Motivering van de gebruikte testmethode en het gebruikte protocol**Integriteit van de testmethode*

De gebruikte procedure ter verzekering van de integriteit (d.w.z. nauwkeurigheid en betrouwbaarheid) van de testmethode in de tijd (d.w.z. periodiek testen van stoffen voor bekwaamheidstoetsing, gebruik van historische negatieve en positieve controlegegevens).

*Criteria voor aanvaardbare test*

Aanvaardbare tegelijkertijd gemeten positieve en negatieve controlebereiken gebaseerd op historische gegevens.

Indien van toepassing, aanvaardbare tegelijkertijd gemeten referentiecontrolebereiken gebaseerd op historische gegevens.

*Testomstandigheden*

Beschrijving van het gebruikte testsysteem.

Type gebruikte corneahouder.

Informatie met betrekking tot de kalibratie voor apparaten die voor de meting van troebelheid en permeabiliteit worden gebruikt (bv. opacitometer en spectrofotometer).

Informatie over de gebruikte bovine cornea's, met inbegrip van de verklaring betreffende hun kwaliteit.

Gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure.

De gehanteerde concentratie(s) van de teststoffen.

Beschrijving van enige wijziging van de testprocedure.

Verwijzing naar historische gegevens van het model (bv. negatieve en positieve controles, stoffen voor de bekwaamheidstoetsing, ijkstoffen).

Beschrijving van de gebruikte beoordelingscriteria.

#### Resultaten

Tabel met de gegevens van individuele testmonsters (bv. troebelheid en OD<sub>490</sub>-waarden en berekende IVIS voor de teststof en de positieve, negatieve en referentiecontroles [indien inbegrepen], weergegeven in tabelvorm, met inbegrip van gegevens van herhaalde experimenten met identieke monsters indien van toepassing, en gemiddelde  $\pm$  de standaardafwijking voor elk experiment).

Beschrijving van andere waargenomen effecten.

#### Bespreking van de resultaten

#### Conclusies

#### LITERATUUR

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006. PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Beschikbaar:  
  
[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)].
- (4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Beschikbaar:  
  
[<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. Beschikbaar:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
- (6) Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie. PB L 396 van 30.12.2006, blz. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Beschikbaar:  
  
[[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)].



- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Beschikbaar:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Beschikbaar:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_ice.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)].
- (10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 442-449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Beschikbaar:
- [<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. Beschikbaar:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].
- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Beschikbaar:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].

---

#### Bijlage 1

#### DEFINITIONS

**Nauwkeurigheid:** de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie”. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt.

**Ijkstof:** een stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof dient de volgende eigenschappen te hebben: (i) (een) constante en betrouwbare bron(nen); (ii) een structurele en functionele gelijkenis met de klasse stoffen die getest wordt; (iii) bekende fysische/chemische kenmerken; (iv) ondersteunende gegevens over bekende effecten en (v) een bekende werkzaamheid binnen het bereik van de gewenste respons.

**Cornea:** het doorschijnende gedeelte van het voorste deel van de oogbal dat de iris en pupil bedekt en licht naar binnen toelaat.

**Corneale troebelheid:** meting van de mate van troebelheid van de cornea na blootstelling aan een teststof. Verhoogde corneale troebelheid is een aanwijzing voor schade aan de cornea. De troebelheid kan subjectief worden beoordeeld aan de hand van bijvoorbeeld de Draize-oogtest bij konijnen of objectief met een instrument zoals een „opacimeter”.

**Corneale permeabiliteit:** kwantitatieve meting van de schade aan het hoornvliesepitheel door bepaling van de hoeveelheid natriumfluoresceïne die door alle corneale cellagen dringt.

**EPA-klasse 1:** corrosieve (irreversibele afbraak van oogweefsel) of corneale aandoening of irritatie die gedurende meer dan 21 dagen aanhoudt (1).

**EU-klasse R41:** veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging (2).

**Percentage vals-negatieve uitslagen:** het percentage van alle positieve stoffen dat door een testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

**Percentage vals-positieve uitslagen:** het percentage van alle negatieve stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals):** een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (3).

**GHS-klasse 1:** veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag, die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging (3).

**Gevaar:** inherente eigenschap van een agens of situatie die schadelijke effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

**In-vitro-irritatiescore (IVIS):** een empirisch afgeleide formule die gebruikt wordt in het BCOP-onderzoek waarbij de gemiddelde troebelheid en de gemiddelde permeabiliteit voor elke behandelingsgroep gecombineerd worden in één enkele in-vitro score voor elke behandelingsgroep.  $IVIS = \text{gemiddelde troebelheidswaarde} + (15 \times \text{gemiddelde permeabiliteitswaarde})$

**Negatieve controle:** een onbehandeld monster dat alle bestanddelen van een testsysteem bevat. Dit monster wordt tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

**Niet-irriterend:** een stof die niet is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van EPA-klasse I, II, of III, EU-klasse R41 of R36 of GHS-klasse 1, 2A, of 2B.

**Voor de ogen corrosieve stof:** (a) een stof die irreversibele weefselschade veroorzaakt aan de ogen; (b) een stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, EPA-klasse I of EU-klasse R41 (1) (2) (3).

**Voor de ogen irriterende stof:** (a) een stof die een reversibele wijziging in het oog teweegbrengt na aanbrenging op het voorste oogoppervlak; (b) een stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van EPA-klasse II of III, EU-klasse R36 of GHS-klasse 2A of 2B (1) (2) (3).

**Voor de ogen hevig irriterende stof:** (a) een stof die na aanbrenging op het voorste oogoppervlak weefselschade aan het oog veroorzaakt die meer dan 21 dagen na aanbrenging aanhoudt of die ernstige fysische gezichtsvermindering teweegbrengt; (b) een stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, EPA-klasse I of EU-klasse R41 (1) (2) (3).

**Opacitometer:** een instrument dat gebruikt wordt om de „corneale troebelheid” te meten door kwantitatieve beoordeling van lichttransmissie door de cornea. Gewoonlijk bestaat dit instrument uit twee compartimenten, elk met een eigen lichtbron en fotocel. Eén compartiment wordt gebruikt voor de behandelde cornea, terwijl het andere wordt gebruikt voor de ijking en de nulinstelling van het instrument. Licht van een halogeenlamp wordt door een controlecompartiment (lege kamer zonder vensters of vloeistof) naar een fotocel gestuurd en vergeleken met het licht dat door een experimenteel compartiment, bestaande uit de kamer met de cornea, naar een fotocel wordt gestuurd. Het verschil in lichttransmissie van de fotocellen wordt vergeleken en er wordt een numerieke troebelheidswaarde weergegeven op een digitaal scherm.

**Positieve controle:** een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat de variabiliteit in de positieve-controterespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de „hevig irritatie”-respons niet buitensporig zijn.

**Betrouwbaarheid:** indicator van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt bepaald door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid.

**Controle met oplosmiddel/medium:** een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of medium, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of medium opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten negatieve controle, toont het ook aan of het oplosmiddel of medium met het testsysteem interageert.

**Trapsgewijs testen:** een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende testen niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

**Gevalideerde testmethode:** een testmethode waarvoor valideringsonderzoeken werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel.

**Bewijskracht:** het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een stof.

---

#### Bijlage 2

### Stoffen voor bekwaamheidstoetsing voor de BCOP-testmethode

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van een testmethode die samenhangt met deze testmethode, kan het zijn dat laboratoria de technische bekwaamheid wensen aan te tonen door een correcte identificatie van de indeling als corrosief voor de ogen van de 10 stoffen die in tabel 1 worden aangeraden. Deze stoffen werden geselecteerd om een reeks responsen te vertegenwoordigen voor plaatselijke oogirritatie/-corrosie die gebaseerd is op de resultaten van de *in-vivo*-oogtesten op konijnen (TG 405) (d.w.z. klassen 1, 2A, 2B of niet ingedeeld en geëtiketteerd volgens de UN GHS (3) (7)). Rekening houdend met het gevalideerde nut van deze onderzoeken (d.w.z. enkel om voor de ogen corrosieve/hevig irriterende stoffen te identificeren), zijn er slechts twee testresultaten voor classificatiedoeleinden (corrosief/hevig irriterend of niet-corrosief/niet-hevig irriterend) om bekwaamheid aan te tonen. Andere selectiecriteria zijn dat stoffen commercieel beschikbaar zijn, dat er *in-vivoreferentiegegevens* van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn, en dat er gegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn van de twee *in-vitro*methoden waarvoor op dit ogenblik testrichtsnoeren worden opgesteld. Om die reden werden irriterende stoffen geselecteerd van de ICCVAM-lijst van 122 aanbevolen ijkstoffen voor de validering van *in-vitro*testmethoden voor oogtoxiciteit (zie bijlage H: ICCVAM Recommended Reference Substances) (5). Referentiegegevens zijn beschikbaar in de ICCVAM Background Review Documents for BCOP and Isolated Chicken Eye (ICE) test methods (17) (18).

Tabel 1

Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met BCOP

Stof	CAS RN	Chemische klasse <sup>(1)</sup>	Fysische vorm	In-vivo-classificatie <sup>(2)</sup>	In-vitro-classificatie <sup>(3)</sup>
Benzalkoniumchloride (5%)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeibaar	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Chloorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	Vast	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Dibenzoyl-L-wijnsteenzuur	2743-38-6	Carbonzuur, ester	Vast	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Imidazool	288-32-4	Hetero-cyclisch	Vast	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Trichloorazijn-zuur (30%)	76-03-9	Carbonzuur	Vloeibaar	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
2,6-Dichloor-benzoylchloride	4659-45-4	Acyhalo-genide	Vloeibaar	Klasse 2A	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
Ethyl-2-methylacetoacetaat	609-14-3	Keton, ester	Vloeibaar	Klasse 2B	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
Ammonium-nitraat	6484-52-2	Anorganisch zout	Vast	Klasse 2A	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
Glycerol	56-81-5	Alcohol	Vloeibaar	Niet ingedeeld	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
n-Hexaan	110-54-3	Koolwater-stof (acyclisch)	Vloeibaar	Niet ingedeeld	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend

Afkortingen: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number.

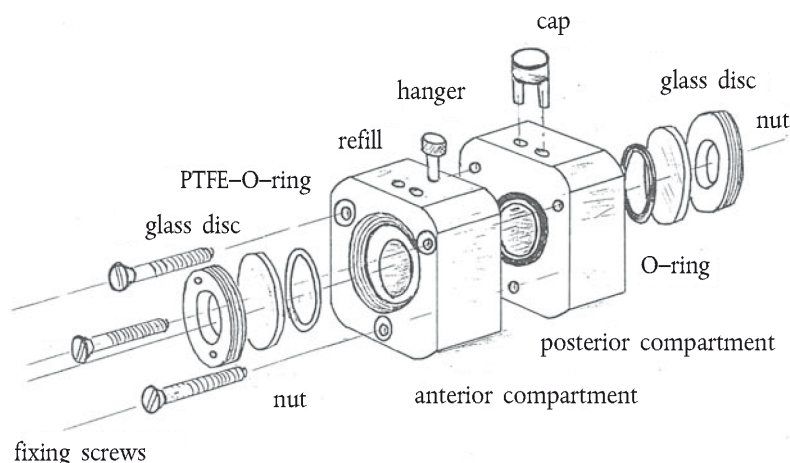
<sup>(1)</sup> Scheikundige klassen werden toegekend aan elke teststof aan de hand van een standaardclassificatieschema gebaseerd op het classificatiesysteem van de National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (beschikbaar op: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).<sup>(2)</sup> Gebaseerd op de resultaten van de *in-vivo*-oogtest op konijnen (OESO TG 405) en aan de hand van de UN GHS (3)(7).<sup>(3)</sup> Gebaseerd op resultaten in BCOP en ICE.

## Bijlage 3

## DE BCOP-CORNEAHOUDER

1. De BCOP-corneahouders zijn gemaakt van inert materiaal (bv. polypropyleen). De houders bestaan uit twee helften (een voorste en een achterste kamer) en hebben twee gelijke cilindrische inwendige kamers. Elke kamer heeft een inhoud van 5 ml en is afgewerkt met een glazen venster waardoor de troebelheidsmetingen worden opgetekend. Elk van de inwendige kamers heeft een diameter van 1,7 cm en is 2,2 cm diep <sup>(1)</sup>. De achterste kamer is voorzien van een o-ring om lekkage te voorkomen. De cornea's worden op de o-ring van de achterste kamers geplaatst met de endotheelzijde naar beneden en de voorste kamers worden op de epitheelzijde van de cornea's geplaatst. De kamers worden op hun plaats gehouden door drie schroeven van roestvrij staal die zich bevinden aan de randen van de kamer. Aan het einde van elke kamer bevindt zich een vensterglas dat verwijderd kan worden voor gemakkelijke toegang tot de cornea. Tussen het vensterglas en de kamer bevindt zich eveneens een o-ring om lekkage te voorkomen. Elke kamer heeft bovenaan twee openingen voor toevoeging en verwijdering van media en testverbindingen. Tijdens de behandeling en de incubatieperiode worden zij afgesloten met een rubberdop.

<sup>(1)</sup> De opgegeven afmetingen zijn gebaseerd op een corneahouder die wordt gebruikt voor koeien tussen 12 en 60 maanden oud. Indien dieren tussen 6 en 12 maanden worden gebruikt, dan dient de houder zodanig te worden ontworpen dat elke kamer een inhoud heeft van 4 ml en elk van de interne kamers een diameter heeft van 1,5 cm en diepte van 2,2 cm. Voor elke nieuw-ontworpen corneahouder is het zeer belangrijk dat de verhouding tussen het blootgestelde corneale oppervlak en de kamerinhoud dezelfde is als de verhouding in de traditionele corneahouder. Dit is noodzakelijk om te verzekeren dat de permeabiliteitswaarden correct bepaald worden voor de berekening van de IVIS aan de hand van de voorgestelde formule.



#### Legenda

Glass disc: vensterglas

PTFE-O-ring: PTFE-o-ring

Refill: vulopening

Hanger: houder

Cap: rubberdop

Nut: moer

O-ring: o-ring

Posterior compartment: achterste kamer

Anterior compartment: voorste kamer

Fixing screws: bevestigingsschroeven

#### DE OPACITOMETER

2. De opacitometer is een meetapparaat voor lichttransmissie. Licht van een halogeenlamp wordt door een controlebestanddeel (lege kamer zonder vensters of vloeistof) naar een fotocel gestuurd en vergeleken met het licht dat door een experimenteel bestanddeel, dat de kamer met de cornea bevat, naar een fotocel wordt gestuurd. Het verschil in lichttransmissie van de fotocellen wordt vergeleken en er wordt een numerieke troebelheidswaarde weergegeven op een digitaal scherm. De troebelheidseenheden worden vastgesteld.
3. De troebelheidsmeter dient een lineaire respons te geven met een reeks troebelheidswaarden inclusief de grenswaarden van de verschillende klassen zoals beschreven in het voorspellend model (d.w.z. tot aan de grenswaarde die de corrosiviteit/het hevig irriterend karakter bepaalt). Om lineaire en nauwkeurige waarden tot een troebelheid van 75-80 te verzekeren, dient de opacitometer te worden gekalibreerd met een reeks kalibratiemiddelen. Kalibratiemiddelen (ondoorschijnende polyesterplaten) worden in de kalibratiekamer (een corneale kamer speciaal ontworpen voor het plaatsen van de kalibratiemiddelen) geplaatst en afgelezen op de opacitometer. De kalibratiekamer is zodanig ontworpen dat de kalibratiemiddelen op ongeveer dezelfde afstand tussen het licht en de fotocel geplaatst zijn als de cornea's tijdens de troebelheidsmetingen. De opacitometer wordt eerst op 0 troebelheidseenheden gekalibreerd aan de hand van een kalibratiekamer zonder kalibreermiddel. Daarna worden drie verschillende kalibratiemiddelen één voor één in de kalibratiekamer geplaatst en worden de troebelheidswaarden gemeten. Kalibratiemiddelen 1, 2 en 3 dienen te resulteren in troebelheidsmetingen die gelijk zijn aan hun vastgestelde waarden van respectievelijk 75, 150 en 225 troebelheidseenheden  $\pm 5\%$ .

**B.48 ISOLATED CHICKEN EYE-TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN VOOR HET OOG CORROSIEVE EN HEVIG IRRITERENDE STOFFEN****INLEIDING**

1. De Isolated Chicken Eye-testmethode (ICE) is een *in-vitro* testmethode die onder bepaalde omstandigheden en met bepaalde beperkingen kan worden gebruikt om stoffen en mengsels in te delen als voor de ogen corrosief en hevig irriterend (1) (2) (3). Voor het doel van dit testmethode worden hevig irriterende stoffen gedefinieerd als stoffen die bij konijnen oogletsels veroorzaken die minstens 21 dagen na de aanbrenging voortduren. Hoewel ICE niet als een volwaardige vervanger voor de *in-vivo*-oogtest bij konijnen wordt beschouwd, wordt deze methode toch aangeraden als onderdeel van een trapsgewijze teststrategie voor de indeling en etikettering volgens de regelgeving binnen een bepaald toepassingsgebied (4) (5). Teststoffen en mengsels (6) die in dit onderzoek positief zijn, kunnen zonder bijkomende testen op konijnen worden ingedeeld als stoffen die oogcorrosie of hevige irritatie veroorzaken. Een stof die negatief test, dient op konijnen te worden getest met een sequentiële teststrategie zoals uiteengezet in de technische richtsnoeren van de OESO (OECD Test Guidelines 405 (7) - zie hoofdstuk B.5 van deze bijlage).
2. Het doel van deze testmethode is het beschrijven van de procedures die worden gebruikt om de mogelijke corrosie of hevige irritatie van een teststof voor de ogen te beoordelen aan de hand van het vermogen van deze stof om toxiciteit op te wekken in een verwijderd kippenoog. Toxische effecten op de cornea worden gemeten door (i) een kwalitatieve beoordeling van de troebelheid, (ii) een kwalitatieve beoordeling van de schade aan de epitheel laag op basis van aanbrenging van fluoresceïne op het oog (fluoresceïne-retentie), (iii) een kwantitatieve meting van toegenomen dikte (zwellen) en (iv) een kwalitatieve beoordeling van macroscopische morfologische schade aan het oppervlak. De beoordelingen van de corneale troebelheid, zwellen en schade na blootstelling aan een teststof worden individueel beoordeeld en daarna gecombineerd om een oogirritatieklasse te kunnen afleiden.
3. Voor de ogen irriterende stoffen die letsels veroorzaken die in minder dan 21 dagen verdwijnen en stoffen die niet-irriterend zijn, werden ook getest met de ICE-methode. De nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de ICE-testmethode voor stoffen van deze klassen werden echter nog niet formeel beoordeeld.
4. Definities worden gegeven in bijlage 1.

**TOELICHTING EN BEPERKINGEN**

5. Deze testmethode is gebaseerd op het protocol van de ICE-testmethode van het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (8) dat ontwikkeld werd naar aanleiding van een internationale valideringsstudie (4)(5)(9) met bijdragen van het European Centre for the Validation of Alternative Methods, het Japanese Center for the Validation of Alternative Methods en TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederland). Het protocol is gebaseerd op informatie verkregen uit gepubliceerde protocollen alsook het huidige door TNO gebruikte protocol (10) (11) (12) (13) (14).
6. De geïdentificeerde beperkingen van deze methode zijn gebaseerd op het percentage vals-positieve resultaten voor alcoholen en het percentage vals-negatieve resultaten voor vaste stoffen en oppervlakteactieve stoffen (zie paragraaf 47) (4). De nauwkeurigheid van ICE in het EU-, EPA- en GHS-classificatiesysteem verbetert aanzienlijk als stoffen die tot deze chemische en fysische klassen behoren uit de gegevensbank worden verwijderd (4). Op basis van het doel van dit onderzoek (d.w.z. het identificeren van enkel stoffen die oogcorrosie/hevige irritatie veroorzaken) zijn vals-negatieve resultaten niet doorslaggevend aangezien deze stoffen nadien getest worden op konijnen of met andere gevalideerde *in-vitro* testen afhankelijk van wetgevende vereisten, door gebruik van een sequentiële teststrategie in een benadering met meervoudige bewijsvoering („weight of evidence” benadering). Bovendien liet de huidige valideringsgegevensbank geen ruimte voor een adequate beoordeling van sommige chemische producten of productklassen (bv. mengsels). Onderzoekers kunnen echter overwegen deze testmethode te gebruiken voor alle soorten testmateriaal (met inbegrip van mengsels) waarbij een positief resultaat kan worden aangenomen als een aanwijzing van een voor de ogen corrosieve of hevige irriterende respons. Positieve resultaten die verkregen werden met alcoholen dienen echter met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd omwille van het risico van overpredictie.
7. Alle procedures met kippenogen dienen de op de testinrichting toepasselijke regelgeving en procedures voor de behandeling van menselijke of van dieren afkomstige materialen na te leven, met inbegrip van maar niet beperkt tot weefsels en weefselvloeistoffen. Universele voorzorgsmaatregelen voor laboratoria zijn aanbevolen (15).
8. Een beperking van de testmethode is dat deze methode weliswaar rekening houdt met sommige in de oogirritatie-testmethode bij het konijn waargenomen effecten op het oog en in bepaalde mate hun ernst, maar dat ze geen rekening houdt met letsels van het ooglid en de iris. Hoewel de reversibiliteit van hoornvliesletsels op zichzelf niet kan worden beoordeeld in de ICE-testmethode, werd bovendien voorgesteld, op basis van studies op de ogen van konijnen, dat een beoordeling van de aanvankelijke diepte van het hoornvliesletsel kan worden gebruikt om een onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele effecten (16). Tot slot kan de ICE-testmethode niet worden gebruikt voor een beoordeling van de mogelijkheid van met blootstelling van het oog geassocieerde systemische toxiciteit.
9. Er worden inspanningen geleverd om het nut en de beperkingen van de ICE-testmethode voor de identificatie van niet-hevig irriterende stoffen en niet-irriterende stoffen (zie ook paragraaf 48) verder te typeren. Gebruikers worden eveneens aangemoedigd om monsters en/of gegevens te leveren aan valideringsorganisaties voor een formele evaluatie van mogelijk toekomstig gebruik van de ICE-testmethode, met inbegrip van de identificatie van voor de ogen niet-hevig irriterende stoffen en niet-irriterende stoffen.



10. Elk laboratorium dat dit onderzoek voor het eerst opstelt, dient gebruik te maken van de in bijlage 2 voorziene chemicaliën voor bekwaamheidstoetsing. Een laboratorium kan deze chemicaliën gebruiken om zijn technische bekwaamheden met betrekking tot het uitvoeren van de ICE-testmethode aan te tonen vooraleer het ICE-onderzoeksgegevens indient voor de wettelijke gevarenclassificatie.

#### PRINCIPE VAN DE TEST

11. De ICE-testmethode is een organotypisch model dat handhaving op korte termijn van het kippenoog *in vitro* vereist. In deze testmethode wordt schade door de teststof beoordeeld door vaststelling van corneale zwelling, troebelheid en fluoresceïne-retentie. Daar waar de laatste twee parameters een kwalitatieve beoordeling vergen, vereist de analyse van de corneale zwelling een kwantitatieve beoordeling. Elke meting wordt ofwel omgezet in een kwantitatieve score die gebruikt wordt voor de berekening van een algemene irritatie-index, ofwel een kwalitatieve indeling toegekend die gebruikt wordt voor de toekenning van een *in-vitro*-indeling van corrosiviteit en hevig irriterend karakter voor de ogen. Elk van deze resultaten kan dan worden aangewend om de potentiële *in-vivo*corrosiviteit en het hevig-irriterende karakter van een teststof te voorspellen (zie beslissingscriteria).

#### Bron en ouderdom van de kippenogen

12. In het verleden werden voor dit onderzoek steeds ogen verzameld van kippen uit de slachterij die geslacht werden voor de menselijke consumptie waardoor er geen nood was aan proefdieren. Enkel ogen van gezonde dieren die geschikt zijn voor de menselijke voedselketen worden gebruikt.
13. Hoewel een gecontroleerde studie voor de beoordeling van de ideale leeftijd van de kip nog niet werd gevoerd, was de leeftijd en het gewicht van de in deze testmethode gebruikte kippen in het verleden dat van piepkuijken van oudsher geslacht in een pluimveeslachterij (d.w.z. ongeveer 7 weken oud, 1,5 - 2,5 kg).

#### Verzameling en vervoer van ogen naar het laboratorium

14. Na verdoving van de kippen, meestal met een elektrische schok, en incisie in de nek voor bloeding, dient de kop onmiddellijk verwijderd te worden. Er dient een plaatselijke bron van kippen, niet ver van het laboratorium te worden gezocht zodat de koppen snel genoeg van de slachterij naar het laboratorium kunnen worden vervoerd om bederf en/of bacteriële besmetting zoveel mogelijk te beperken. Het tijdsinterval tussen de verzameling van de koppen en het gebruik van de ogen in de ICE-testmethode dient te worden beperkt tot een minimum (gewoonlijk minder dan twee uur) en mag de onderzoeksresultaten niet in gevaar brengen. Deze resultaten zijn gebaseerd op de selectiecriteria voor de ogen alsook op de positieve en negatieve controle responsen. Alle in het onderzoek gebruikte ogen dienen van dezelfde groep op een bepaalde dag verzamelde ogen te zijn.
15. Aangezien de ogen in het laboratorium ontleed worden, worden de koppen intact en op omgevingstemperatuur van de slachterij vervoerd in plastic dozen, bevochtigd met in isotoon zout gedrenkte doeken.

#### Selectiecriteria voor in de ICE-test gebruikte ogen

16. Ogen die een hoge referentie-fluoresceïneverkleuring (d.w.z. > 0,5) of corneale troebelheidsscore (d.w.z. > 0,5) vertonen, worden na verwijdering verworpen.
17. Elke behandelingsgroep en tegelijkertijd gemeten positieve controle bestaat uit ten minste drie ogen. De negatieve controlegroep of de controle met oplosmiddel (indien een ander oplosmiddel dan zout gebruikt wordt) bestaat uit ten minste één oog.

#### PROCEDURE

##### Vorbereiding van de ogen

18. De oogleden worden zorgvuldig verwijderd zodat geen schade wordt berokkend aan de cornea. De corneale integriteit kan eenvoudig worden beoordeeld met een druppel van 2 % (g/v) natriumfluoresceïne die gedurende enkele seconden wordt aangebracht op het hoornvliesoppervlak en daarna uitgewassen met een isotone zoutoplossing. Met fluoresceïne behandelde ogen worden daarna onderzocht met een spleetlampmicroscop om er zeker van te zijn dat de cornea niet beschadigd is (d.w.z. fluoresceïne-retentie en corneale troebelheidsscore ≤ 0,5).
19. Indien het oog onbeschadigd is, wordt het voorzichtig verder verwijderd uit de schedel zonder de cornea te beschadigen. De oogbal wordt van de oogrand getrokken door het derde ooglid stevig vast te houden met een chirurgische tang terwijl de oogspier afgesneden wordt met een kromme schaar met botte punten. Het is belangrijk schade aan de cornea door buitensporige druk (d.w.z. misvorming door samendrukking) te voorkomen.
20. Als het oog van de oogrand verwijderd is, zou een zichtbaar gedeelte van de oogzenuw nog aangehecht moeten zijn. Zodra het oog van de oogrand verwijderd is, wordt het op een absorberend verband gelegd en worden het derde ooglid en ander bindweefsel weggesneden.

21. Het verwijderde oog wordt op een klem van roestvrij staal geplaatst met de cornea in verticale positie. De klem wordt dan overgebracht naar een kamer van het superfusieapparaat (16). De klemmen dienen zodanig in het superfusieapparaat te worden gemonteerd dat de volledige cornea bedekt wordt door de isotone zoutinfusie. In de kamers van het superfusieapparaat moet een temperatuur van  $32 \pm 1,5$  °C worden gehandhaafd. Bijlage 3 bevat een diagram van een typisch superfusieapparaat met oogklemmen, dat verkrijgbaar is in de handel of zelf kan worden gemaakt. Het apparaat kan worden aangepast aan de behoeften van elk individueel laboratorium (bv. om ander aantal ogen te houden).
22. Nadat ze in het superfusieapparaat geplaatst zijn, worden de ogen nogmaals onderzocht met een spleetlampmicroscoop om te controleren dat er zich tijdens de dissectieprocedure geen schade heeft voorgedaan. Met behulp van de dieptemeter van de spleetlampmicroscoop wordt meteen ook de corneale dikte gemeten ter hoogte van de corneale apex. Ogen met (i) een fluoresceïne-retentiescore van  $> 0,5$ ; (ii) corneale troebelheid  $> 0,5$ ; (iii) elk bijkomend teken van schade, dienen te worden vervangen. Individuele ogen die niet werden verwijderd op basis van de voorgaande criteria dienen te worden verwijderd indien de corneale dikte met meer dan 10 % afwijkt van de gemiddelde waarde van alle ogen. Gebruikers dienen zich te realiseren dat spleetlampmicroscopen verschillende resultaten voor corneale dikte kunnen opleveren naargelang van de instelling van de breedte van de spleet. De breedte van de spleet dient te worden ingesteld op 0,095 mm.
23. Zodra alle ogen onderzocht en goedgekeurd zijn, worden de ogen gedurende ongeveer 45 tot 60 minuten geïncubeerd om ze vóór de dosering te equilibreren met het testsysteem. Na de equilibratieperiode wordt een nulreferentiemeting opgetekend voor de corneale dikte en troebelheid die zal dienen als referentie (d.w.z. tijd = 0). De fluoresceïnescore die bepaald wordt bij de ontleding wordt gebruikt als referentiemeting voor dat eindpunt.

#### **Aanbrengen van de teststof**

24. Onmiddellijk na de nulreferentiemetingen wordt het oog (in de houder) verwijderd uit het superfusieapparaat, in horizontale positie geplaatst, en wordt de teststof aangebracht op de cornea.
25. Vloeibare teststoffen worden gewoonlijk onverdund getest, maar kunnen worden verdund indien dit nodig blijkt te zijn (bv. als onderdeel van de onderzoeksopzet). Het aanbevolen oplosmiddel voor verdunde stoffen is fysiologische zoutoplossing. Andere oplosmiddelen mogen echter ook worden gebruikt in gecontroleerde omstandigheden maar indien aan een ander oplosmiddel dan fysiologische zoutoplossing de voorkeur wordt gegeven, dient dit te worden gemotiveerd.
26. Vloeibare teststoffen worden zodanig aangebracht op de cornea dat het gehele oppervlak van de cornea gelijk bedekt is met de teststof; het standaardvolume is 0,03 ml.
27. Indien mogelijk, dienen de vaste stoffen zo fijn mogelijk gemalen te worden in een vijzel of een vergelijkbaar maalinstrument. Het poeder wordt zodanig op de cornea aangebracht dat het hele oppervlak gelijk bedekt is met de teststof; de standaardhoeveelheid is 0,03 g.
28. De testvloeistof (vloeibaar of vast) wordt gedurende 10 seconden toegediend en dan weggespoeld met isotone zoutoplossing (ongeveer 20 ml) op omgevingstemperatuur. Het oog (in de houder) wordt daarna terug in het superfusieapparaat geplaatst in de oorspronkelijke rechtopstaande positie.

#### **Controlestoffen**

29. In elk experiment moeten gelijktijdig gemeten negatieve controles of controles met oplosmiddel/medium en positieve controles worden opgenomen.
30. Bij het testen van vloeistoffen aan 100 % of vaste stoffen wordt fysiologische zoutoplossing gebruikt als tegelijkertijd gemeten negatieve controle in de ICE-testmethode om niet-specifieke veranderingen in het testsysteem op te sporen en om te garanderen dat de onderzoeksomstandigheden niet ongewenst leiden tot een irriterende respons.
31. Bij het testen van verdunde vloeistoffen wordt een tegelijkertijd gemeten controlegroep van oplosmiddelen/media opgenomen in de testmethode om niet-specifieke veranderingen in het testsysteem op te sporen en om te garanderen dat de onderzoeksomstandigheden niet ongewenst leiden tot een irriterende respons. Zoals gesteld in paragraaf 25, kunnen enkel oplosmiddelen/media worden gebruikt waarvan geweten is dat ze geen nadelig effect op het testsysteem hebben.

32. Een bekende voor de ogen irriterende stof wordt in elk experiment opgenomen als gelijktijdige positieve controle om na te gaan of de juiste respons wordt opgewekt. Aangezien het ICE-onderzoek in deze testmethode wordt gebruikt om corrosieve en hevig irriterende stoffen te identificeren, is het best dat de positieve controle gebeurt met een referentiestof die een hevige respons opwekt in deze testmethode. Om te verzekeren dat de variabiliteit in de positieve-controterespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de hevig irriterende respons echter niet buitensporig zijn. Voor de positieve controle dienen voldoende *in-vitro*gegevens te worden gegenereerd zodat een statistisch gedefinieerde aanvaardbare reeks voor de positieve controle kan worden berekend. Indien voor een bepaalde positieve controle geen gepaste historische ICE-testmethodegegevens beschikbaar zijn, dan is het mogelijk dat onderzoek dient te worden verricht om deze gegevens te verkrijgen.
33. Voorbeelden van positieve controles voor vloeibare teststoffen zijn 10 % azijnzuur of 5 % benzalkoniumchloride. Voorbeelden van positieve controles voor vaste teststoffen zijn natriumhydroxide of imidazool.
34. IJkstoffen zijn nuttig voor de beoordeling van potentiële oogirritatie bij onbekende chemicaliën uit een specifieke chemische klasse of productklasse of voor de beoordeling van potentiële relatieve irritatie van een voor het oog irriterende stof binnen een reeks van irritatieresponsen.

#### Gemeten eindpunten

35. Behandelde cornea's worden beoordeeld vóór behandeling en op 30, 75, 120, 180 en 240 minuten ( $\pm 5$  minuten) na het uitwassen na behandeling. Deze punten in de tijd leveren een geschikt aantal metingen op over een behandelingsperiode van vier uur en laten toch voldoende tijd tussen twee metingen voor de vereiste waarnemingen voor alle ogen.
36. De eindpuntbeoordelingen zijn corneale troebelheid, zwelling, fluoresceïne-retentie en morfologische effecten (bv. kuilvorming of loskomen van de epitheellaag). Alle eindpunten, met uitzondering van de fluoresceïne-retentie (die enkel wordt bepaald bij de voorbehandeling en 30 minuten na blootstelling aan de teststof) worden bepaald op elk van de bovenvermelde tijdstippen.
37. Het nemen van foto's wordt aanbevolen als documentatie van corneale troebelheid, fluoresceïne-retentie, morfologische effecten en, indien uitgevoerd, histopathologie.
38. Na het laatste onderzoek, na vier uur, worden gebruikers aangespoord om de ogen te bewaren in het gepaste fixeermiddel (d.w.z. neutrale gebufferde formaldehyde) voor eventueel histopathologisch onderzoek.
39. Corneale zwelling wordt bepaald aan de hand van de diktemetingen van de cornea met een optische pachymeter op een spleetlampmicroscop. Zij wordt uitgedrukt als percentage en wordt berekend vanuit de corneale diktemetingen volgens de volgende formule:

$$\left( \frac{\text{corneale dikte op tijdstip } t - \text{corneale dikte op tijdstip } = 0}{\text{corneale dikte op tijdstip } = 0} \right) \times 100$$

40. Het gemiddelde percentage van corneale zwelling voor alle testogen wordt berekend voor alle waarnemingstijdstippen. Op basis van de hoogste gemiddelde score voor corneale zwelling, zoals die op elk tijdstip is waargenomen, wordt dan een algemene categoriescore toegekend aan elke teststof.
41. De score voor corneale troebelheid wordt berekend aan de hand van het gebied van de cornea waar de troebelheid het dichtst is. De gemiddelde waarde van de corneale troebelheid voor alle testogen wordt berekend voor alle waarnemingstijdstippen. Op basis van de hoogste gemiddelde score voor corneale troebelheid, zoals die op elk tijdstip is waargenomen, wordt dan een algemene categoriescore toegekend aan elke teststof (tabel 1).

Tabel 1

#### Corneale troebelheidsscores

Score	Waarneming
0	Geen troebelheid
0,5	Zeer zwakke troebelheid

Score	Waarneming
1	Verspreide of diffuse gebieden; details van de iris zijn duidelijk zichtbaar
2	Gemakkelijk te onderscheiden doorschijnend gebied; details van de iris zijn enigszins vervaagd
3	Ernstige corneale troebelheid; details van de iris niet zichtbaar; omvang van de pupil nauwelijks zichtbaar
4	Volledige corneale troebelheid; iris onzichtbaar

42. De gemiddelde fluoresceïne-retentiewaarde voor alle testogen wordt enkel berekend op het tijdstip van de 30<sup>e</sup> minuut dat gebruikt wordt voor de algemene score die aan elke teststof gegeven wordt (tabel 2).

Tabel 2

## Fluoresceïne-retentiescores

Score	Waarneming
0	Geen fluoresceïne-retentie
0,5	Minieme enkelcellige verkleuring
1	Enkelcellige verkleuring verspreid over het behandelde oppervlak van de cornea
2	Geconcentreerde of samenvloeiende enkelcellige verkleuring
3	Samenvloeiende grotere oppervlakken van de cornea met fluoresceïne

43. Morfologische effecten zijn bijvoorbeeld „kuilvorming” van de corneale epitheelcellen, „loskomen” van de epitheellaag, „ongelijkmatig worden” van het corneale oppervlak en „kleven” van de teststof aan de cornea. Deze bevindingen kunnen in hevigheid variëren en kunnen eveneens gelijktijdig voorkomen. De indeling van deze bevindingen is subjectief naargelang de interpretatie van de onderzoeker.

## GEGEVENS EN RAPPORTAGE

**Evaluatie van de gegevens**

44. Resultaten van corneale troebelheid, zwelling en fluoresceïne-retentie dienen afzonderlijk te worden beoordeeld om een ICE-klasse te genereren voor elk eindpunt. De ICE-klassen voor elk eindpunt worden daarna gecombineerd om een irritatieklasse voor elke teststof te genereren.

**Beslissingscriteria**

45. Na beoordeling van elk eindpunt kunnen ICE-klassen worden toegekend op basis van een vooraf vastgestelde reeks. Interpretatie van corneale dikte (tabel 3), troebelheid (tabel 4) en fluoresceïne-retentie (tabel 5) aan de hand van vier ICE-klassen gebeurt volgens de volgende schalen:

Tabel 3

## ICE-indelingscriteria voor corneale dikte

Gemiddelde corneale zwelling (%) (*)	ICE-klasse
0 tot en met 5	I
> 5 tot en met 12	II
> 12 tot en met 18 (> 75 minuten na behandeling)	II
> 12 tot en met 18 (≤ 75 minuten na behandeling)	III
> 18 tot en met 26	III

Gemiddelde corneale zwelling (%) (*)	ICE-klasse
> 26 tot en met 32 (> 75 minuten na behandeling)	III
> 26 tot en met 32 (≤ 75 minuten na behandeling)	IV
> 32	IV

(\*) Scores voor corneale zwelling zijn enkel van toepassing indien de dikte gemeten wordt met een Haag-Streit BP900 spleetlamp-microscop met een dieptemeteapparaat nr. I en spleetbreedte ingesteld op 9½ gelijk aan 0,095mm. Gebruikers dienen zich te realiseren dat spleetlampmicroscopen verschillende resultaten voor corneale dikte kunnen opleveren naargelang van de instelling van de breedte van de spleet.

Tabel 4

## ICE-indelingscriteria voor troebelheid

Gemiddelde maximumtroebelheidsscore (*)	ICE-klasse
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(\*) Zie Tabel 1.

Tabel 5

## ICE-indelingscriteria voor gemiddelde fluoresceïne-retentie

Gemiddelde fluoresceïne-retentiescore 30 minuten na de behandeling (*)	ICE-klasse
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(\*) Zie Tabel 2.

46. De algemene *in-vitro*-irritatieclassificatie voor een teststof wordt beoordeeld door aflezing van de irritatieclassificatie die overeenstemt met de combinatie van de categorieën voor corneale zwelling, corneale troebelheid en fluoresceïne-retentie en door toepassing van het in tabel 6 voorgestelde schema.

Tabel 6

Algemene *in-vitro*-irritatieclassificatie

Classificatie	Combinaties van de 3 eindpunten
Corrosief/hevig irriterend	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Corneale troebelheid ≥ 3 op 30 min (in ten minste 2 ogen) Corneale troebelheid = 4 op elk tijdstip (in ten minste 2 ogen) Ernstig loslaten van de epitheellaag (in ten minste 1 oog)

(\*) Combinaties die zelden voorkomen.

47. Zoals reeds in paragraaf 1 vermeld, dienen bijkomende testen te worden uitgevoerd om deze stof te kunnen indelen en etiketteren, indien de teststof niet geïdentificeerd werd als corrosief of hevig irriterend voor de ogen. De ICE-testmethode heeft een algemene nauwkeurigheidsgraad van 83 % (120/144) tot 87 % (134/154), een percentage vals-positieve uitslagen van 6 % (7/122) tot 8 % (9/116) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 41 % (13/32) tot 50 % (15/30) voor de identificatie van stoffen die corrosief of hevig irriterend zijn voor de ogen in vergelijking met de gegevens van de *in-vivotest* methode op konijnenogen die ingedeeld zijn volgens de EPA- (1), EU- (2) of GHS- (3) classificatiesystemen. Als stoffen binnen bepaalde chemische klassen (d.w.z. alcoholen en oppervlakreactieve stoffen) en fysische klassen (d.w.z. vaste stoffen) uit de gegevensbank gesloten worden, dan varieert de nauwkeurigheid van ICE tussen de EU-, EPA- en GHS-classificatiesystemen van 91 % (72/82) tot 92 % (69/75), het percentage vals-positieve uitslagen van 5 % (4/73) tot 6 % (4/70) en het percentage vals-negatieve uitslagen van 29 % (2/7) tot 33 % (3/9) (4).
48. Zelfs indien geen classificatie als voor de ogen corrosief en hevig irriterend verkregen wordt, dan nog kunnen ICE-gegevens nuttig zijn in combinatie met testgegevens van de *in-vivotest* op konijnenogen of van een degelijk gevalideerde *in-vitro* test voor verdere beoordeling van het nut en de beperkingen van de ICE-testmethode voor de identificatie van niet-hevig irriterende en niet-irriterende stoffen (een richtsnoer over het gebruik van *in-vitro* toxiciteits-testmethoden op ogen is in voorbereiding).

#### Acceptatiecriteria van het onderzoek

49. Een test wordt als aanvaardbaar beschouwd als de tegelijkertijd gemeten negatieve controles of controles met medium/oplosmiddel en de tegelijkertijd gemeten positieve controles een irritatieclassificatie opleveren die valt binnen de klasse van de niet-irriterende stoffen respectievelijk de klasse van de hevig irriterende/corrosieve stoffen.

#### Testverslag

50. Het testverslag dient de volgende informatie te bevatten, indien relevant voor het voeren van het onderzoek:

##### *Test- en controlestoffen*

Chemische benaming(en) zoals de gestructureerde benaming gebruikt door de Chemical Abstracts Service (CAS), gevolgd door andere benamingen indien bekend.

Het CAS-registratienummer (RN), indien bekend.

Zuiverheid en samenstelling van de stof of het mengsel (in percentage(s) per gewicht) voor zover deze informatie beschikbaar is.

Fysisch-chemische eigenschappen zoals de fysische staat, vluchtigheid, pH, stabiliteit, scheikundige klasse, oplosbaarheid in water, die van belang zijn voor het voeren van het onderzoek.

Behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de testen, indien van toepassing (bv. opwarming, malen).

Stabiliteit, indien bekend.

##### *Informatie met betrekking tot de opdrachtgever en de testinstallatie*

Naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de directeur van het onderzoek.

Identificatie van de herkomst van de ogen (d.w.z. de plaats waar ze verzameld werden).

Opslag- en transportomstandigheden van de ogen (bv. datum en tijdstip van de verzameling, tijdsinterval tot aan de aanvang van de testen).

Indien beschikbaar, specifieke kenmerken van de dieren waarvan de ogen werden verzameld (bv. leeftijd, geslacht, gewicht van het donordier).

##### *Motivering van de gebruikte testmethode en het gebruikte protocol*

##### *Integriteit van de testmethode*

De gebruikte procedure ter verzekering van de integriteit (d.w.z. nauwkeurigheid en betrouwbaarheid) van de testmethode in de tijd (d.w.z. periodiek testen van stoffen voor bekwaamheidstoetsing, gebruik van historische negatieve en positieve controlegegevens).



*Criteria voor aanvaardbare test*

Indien van toepassing, aanvaardbare tegelijkertijd gemeten referentiecontrolebereiken gebaseerd op historische gegevens.

*Testomstandigheden*

Beschrijving van het gebruikte testsysteem.

Gebruikte spleetlampmicroscop (bv. model).

De instellingen van de gebruikte spleetlampmicroscop.

Informatie over de gebruikte kippenogen, met inbegrip van mededelingen betreffende hun kwaliteit.

Gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure.

De gehanteerde concentratie(s) van de teststoffen.

Beschrijving van enige wijziging van de testprocedure.

Verwijzing naar historische gegevens van het model (bv. negatieve en positieve controles, stoffen voor de bekwaamheidstoetsing, ijkstoffen).

Beschrijving van de gebruikte beoordelingscriteria.

*Resultaten*

Beschrijving van andere waargenomen effecten.

Indien van toepassing, foto's van het oog.

*Bespreking van de resultaten**Conclusies***LITERATUUR**

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006. PB L 353 van 31.12.2008, blz. 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. Beschikbaar op:  
  
[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)].
- (4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Beschikbaar:  
  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)].
- (5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Beschikbaar:  
  
[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (6) Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie. PB L 396 van 30.12.2006, blz. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Beschikbaar:
- [[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)].
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Beschikbaar:
- [[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. Beschikbaar:
- [[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). Beschikbaar:
- [<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. Beschikbaar:
- [<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. Beschikbaar:
- [[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. Beschikbaar:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)].

*Bijlage 1*

## DEFINITIES

**Nauwkeurigheid:** de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie”. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt.

**Ijkstof:** een stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof dient de volgende eigenschappen te hebben: (i) (een) constante en betrouwbare bron(nen); (ii) een structurele en functionele gelijkenis met de klasse stoffen die getest wordt; (iii) bekende fysische/chemische kenmerken; (iv) ondersteunende gegevens over bekende effecten en (v) een bekende werkzaamheid binnen het bereik van de gewenste respons.

**Cornea:** het doorschijnende gedeelte van het voorste deel van de oogbal dat de iris en pupil bedekt en licht naar binnen toelaat.

**Corneale troebelheid:** meting van de mate van troebelheid van de cornea na blootstelling aan een teststof. Verhoogde corneale troebelheid is een aanwijzing voor schade aan de cornea.

**Corneale zwelling:** een objectieve meting in de ICE-test van de mate van uitzetting van de cornea na blootstelling aan een teststof. Dit wordt uitgedrukt als percentage en wordt berekend vanaf de referentiedikte van de cornea (vóór dosering) en de dikte opgetekend op regelmatige intervallen na blootstelling aan het testmateriaal in de ICE-test. De mate van corneale zwelling is een aanwijzing voor schade aan de cornea.

**EPA-klasse 1:** corrosieve (irreversibele afbraak van oogweefsel) of corneale aandoening of irritatie die gedurende meer dan 21 dagen aanhoudt (1).

**EU-klasse R41:** veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging (2).

**Percentage vals-negatieve uitslagen:** het percentage van alle positieve stoffen dat door de testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

**Percentage vals-positieve uitslagen:** het percentage van alle negatieve stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

**Fluoresceïne-retentie:** een subjectieve meting in de ICE-test van de hoeveelheid natriumfluoresceïne die wordt weerhouden door de epitheelcellen in de cornea na blootstelling aan een teststof. De mate van fluoresceïne-retentie is een aanwijzing voor schade aan de corneale epitheellaag.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals):** een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar worden gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (3).

**GHS-klasse 1:** veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging (3).

**Gevaar:** inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

**Negatieve controle:** een onbehandeld monster dat alle bestanddelen van een testsysteem bevat. Dit monster wordt tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

**Niet-irriterend:** een stof die niet is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van EPA-klasse I, II, of III, EU-klasse R41 of R36 of GHS-klasse 1, 2A, of 2B (1) (2) (3).

**Voor de ogen corrosieve stof:** (a) een stof die irreversibele schade aan het oogweefsel veroorzaakt; (b) een stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, EPA-klasse I of EU-klasse R41 (1) (2) (3).

**Voor de ogen irriterende stof:** (a) een stof die een reversibele wijziging in het oog teweegbrengt na aanbrenging op het voorste oogoppervlak; (b) een stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van EPA-klasse II of III, EU-klasse R36 of GHS-klasse 2A of 2B (1) (2) (3).

**Voor de ogen hevig irriterende stof:** (a) een stof die na aanbrenging op het voorste oogoppervlak weefselschade aan het oog veroorzaakt die niet reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging of die ernstige fysische gezichtsvermindering teweegbrengt; (b) een stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, EPA-klasse I of EU-klasse R41 (1) (2) (3).

**Positieve controle:** een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve-controterespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de „hevig irritatie”-respons niet buitensporig zijn.

**Betrouwbaarheid:** indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid.

**Spleetlampmicroscop:** een instrument dat wordt gebruikt om het oog rechtstreeks te onderzoeken met een binoculaire microscoop die een driedimensionaal, rechtopstaand beeld oplevert. In de ICE-testmethode wordt dit instrument gebruikt om de voorste structuren van het kippenoog te zien alsook om de corneale dikte objectief te kunnen meten met een aangehechte dieptemeter.

**Controle met oplosmiddel/medium:** een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of medium, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of medium opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten negatieve controle, toont het ook aan of het oplosmiddel of medium met het testsysteem interageert.

**Trapsgewijs testen:** een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende testen niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

**Gevalideerde testmethode:** een testmethode waarvoor valideringsonderzoeken werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel.

**Bewijskracht:** het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een stof.

## Bijlage 2

## CHEMISCHE STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING VOOR DE ICE-TESTMETHODE

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van een testmethode die samenhangt met deze testmethode, kan het zijn dat laboratoria de technische bekwaamheid wensen aan te tonen door een correcte identificatie van de indeling als corrosief voor de ogen van de 10 stoffen die in tabel 1 worden aangeraden. Deze stoffen werden geselecteerd om een reeks responsen te vertegenwoordigen voor plaatselijke oogirritatie/-corrosie die gebaseerd is op de resultaten van de *in-vivo*-oogtesten op konijnen (TG 405) (d.w.z. klassen 1, 2A, 2B of niet ingedeeld en geëtiketteerd volgens de UN GHS) (3) (7). Rekening houdend met het gevalideerde nut van deze onderzoeken (d.w.z. enkel om voor de ogen corrosieve/hevig irriterende stoffen te identificeren), zijn er slechts twee testresultaten voor classificatiedoelinden (corrosief/hevig irriterend of niet-corrosief/niet-hevig irriterend) om bekwaamheid aan te tonen. Andere selectiecriteria zijn dat stoffen commercieel beschikbaar zijn, dat er *in-vivoreferentiegegevens* van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn, en dat er gegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn van de twee *in-vitromethoden* waarvoor op dit ogenblik testrichtsnoeren worden opgesteld. Om die reden werden irriterende stoffen geselecteerd van de ICCVAM-lijst van 122 aanbevolen ijkstoffen voor de validering van *in-vitro*testmethoden voor oogtoxiciteit (zie bijlage H: ICCVAM Recommended Reference Substances List) (4). Referentiegegevens zijn beschikbaar in de ICCVAM Background Review Documents for the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and the Isolated Chicken Eye (ICE) test methods (18) (19).

Tabel 1

Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met ICE

Chemische stof	CAS RN	Chemische klasse <sup>(1)</sup>	Fysische vorm	<i>In-vivo</i> -classificatie <sup>(2)</sup>	<i>In-vitro</i> -classificatie <sup>(3)</sup>
Benzalkoniumchloride (5 %)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeibaar	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Chloorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	Vast	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Dibenzoyl-L-wijnsteenzuur	2743-38-6	Carbonzuur, ester	Vast	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Imidazool	288-32-4	Heterocyclisch	Vast	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
Trichloorazijn-zuur (30 %)	76-03-9	Carbonzuur	Vloeibaar	Klasse 1	Corrosief/Hevig irriterend
2,6-Dichloor-benzoylchloride	4659-45-4	Acyhalogenide	Vloeibaar	Klasse 2A	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
Ethyl-2-methylacetoacetaat	609-14-3	Keton, ester	Vloeibaar	Klasse 2B	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
Ammonium-nitraat	6484-52-2	Anorganisch zout	Vast	Klasse 2A	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
Glycerol	56-81-5	Alcohol	Vloeibaar	Niet ingedeeld	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend
n-Hexaan	110-54-3	Koolwaterstof (acyclisch)	Vloeibaar	Niet ingedeeld	Niet-corrosief/Niet-hevig irriterend

Afkortingen: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number

<sup>(1)</sup> Scheikundige klassen werden toegekend aan elke teststof aan de hand van een standaardclassificatieschema gebaseerd op het classificatiesysteem van de National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (beschikbaar op: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(2)</sup> Gebaseerd op de resultaten van de *in-vivo*-oogtest op konijnen (OESO TG 405) en aan de hand van de UN GHS (3)(7).

<sup>(3)</sup> Gebaseerd op resultaten in BCOP en ICE.

Bijlage 3

Diagrammen van het ICE-superfusieapparaat en de oogklemmen

(Zie Burton et al. (17) voor een bijkomende generische beschrijving van superfusieapparaat en oogklem)

