

REGULAMENTUL (UE) NR. 1152/2010 AL COMISIEI

din 8 decembrie 2010

de modificare, în scopul adaptării la progresele tehnice, a Regulamentului (CE) nr. 440/2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, având în vedere Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei ⁽¹⁾, în special articolul 13 alineatul (3),

întrucât:

- (1) Regulamentul (CE) nr. 440/2008 al Comisiei ⁽²⁾ conține metodele de testare care se aplică în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, în scopul determinării proprietăților fizico-chimice, a toxicității și a ecotoxicității substanțelor.
- (2) Este necesară actualizarea Regulamentului (CE) nr. 440/2008 pentru a include cu prioritate două noi metode de testare *in vitro* pentru iritația cutanată adoptate recent de OCDE, în vederea reducerii numărului de animale utilizate în scopuri experimentale,

în conformitate cu Directiva 86/609/CEE a Consiliului din 24 noiembrie 1986 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative ale statelor membre în ceea ce privește protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale și în alte scopuri științifice ⁽³⁾. Părțile interesate au fost consultate cu privire la acest proiect.

- (3) Prin urmare, este necesar ca Regulamentul (CE) nr. 440/2008 să fie modificat în mod corespunzător.
- (4) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului înființat în baza articolului 133 din Regulamentul (CE) nr. 1907/2006,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

În partea B a anexei la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 se adaugă capitolele B.47 și B.48, astfel cum figurează în anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 8 decembrie 2010.

Pentru Comisie
Președintele
José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ JO L 396, 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ JO L 142, 31.5.2008, p. 1.

⁽³⁾ JO L 358, 18.12.1986, p. 1.

ANEXĂ

„B. 47 METODA DE TESTARE A OPACITĂȚII ȘI PERMEABILITĂȚII CORNEENE LA BOVINE PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV SAU UN POTENȚIAL IRITANT SEVER LA NIVEL OCULAR

INTRODUCERE

1. Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* - BCOP) este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite circumstanțe și cu anumite limite de aplicare, în scopul încadrării substanțelor și amestecurilor în categoria «substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular»(1) (2) (3). În sensul prezentei metode de testare, substanțele cu potențial iritant sever sunt definite drept substanțele care induc la iepure leziuni oculare persistente cel puțin 21 de zile după administrare. Deși metoda BCOP nu este considerată adecvată pentru a substitui în totalitate testul *in vivo* pe ochi de iepure, se recomandă utilizarea acestei metode ca parte a strategiei de testare progresivă pentru clasificarea și etichetarea în scopul reglementării în cadrul unui anumit domeniu de aplicabilitate (4) (5). Substanțele și amestecurile de testare (6) pot fi clasificate drept substanțe având un caracter coroziv sau un potențial iritant fără a se efectua teste suplimentare pe iepuri. O substanță al cărui rezultat este negativ va trebui să fie testată pe iepuri prin intermediul unei strategii de testare secvențiale, astfel cum este descris în orientarea OCDE privind testarea nr. 405 (7) (capitolul B.5 din prezenta anexă).
2. Scopul metodei de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul coroziv sau iritant sever la nivel ocular al unei substanțe de test, astfel cum rezultă din capacitatea acesteia de a induce opacitatea și permeabilitatea crescută a unei corneei izolate de bovină. Efectele toxice la nivelul corneei sunt măsurate prin: (i) scăderea transmisiei luminii (opacitate) și (ii) creșterea pătrunderii colorantului fluoresceină sodică (permeabilitate). Evaluarea opacității și a permeabilității corneei după expunerea la o substanță de test se combină pentru a deduce un scor de evaluare a efectelor iritante *in vitro* (*In Vitro Irritancy Score* - IVIS), care se utilizează pentru clasificarea nivelului de iritabilitate a substanței de test.
3. Metoda de testare BCOP a mai fost utilizată pentru testarea unor substanțe cu potențial iritant la nivel ocular, care provoacă leziuni care se vindecă în mai puțin de 21 de zile, și a unor substanțe neiritante. Totuși, precizia și fiabilitatea metodei de încercare BCOP privind substanțele din aceste categorii nu au fost deocamdată evaluate în mod oficial.
4. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

5. Metoda de testare are la bază protocolul metodei de testare BCOP al Comitetului de Coordonare Interagenții cu privire la Validarea Metodelor Alternative (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* - ICCVAM) (8), care a fost dezvoltat în urma unui studiu internațional de validare (4)(5)(9), cu participări din partea Centrului European pentru Validarea Metodelor Alternative (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM) și a Centrului Japonez pentru Validarea Metodelor Alternative (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods* - JaCVAM). Protocolul are la bază informațiile obținute de la Institutul pentru științe *in vitro* (*Institute for in vitro sciences* - IIVS) și Protocolul 124 al INVITTOX (10), care reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de prevalidare al analizei BCOP sponsorizat de Comunitatea Europeană și derulat în perioada 1997-1998. Cele două protocoale se bazează pe metodologia tehnicii BCOP raportată pentru prima dată de Gautheron et al. (11).
6. Limitele de aplicare identificate pentru metoda de testare se datorează ratei ridicate de rezultate fals pozitive pentru alcoolii și cetone și ratei ridicate de rezultate fals negative pentru substanțele solide, observate la nivelul bazei de date de validare [a se vedea alineatul (44)] (5). Atunci când substanțele din aceste clase chimice și fizice sunt eliminate din baza de date, precizia BCOP în funcție de sistemele de clasificare ale UE, EPA și SGA este substanțial ameliorată (5). Având în vedere scopul acestei evaluări (identificarea doar a corozivilor/iritanților severi la nivel ocular), ratele de rezultate fals negative nu sunt critice, deoarece substanțele de acest tip vor fi testate ulterior pe iepuri sau utilizate în cadrul altor teste *in vitro* validate corespunzător, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențială, printr-o abordare având la bază forța probantă a datelor. În plus, baza de date actuală privind validările nu a permis o evaluare adecvată a unor clase chimice sau de produse (de exemplu, amestecurile). Totuși, inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea metodei pentru testarea tuturor tipurilor de materiale (inclusiv amestecuri), în urma căreia un rezultat pozitiv ar putea fi acceptat ca indicator al unei reacții oculare corozive sau sever iritante. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor trebuie interpretate cu prudență, având în vedere riscul de supraestimare.
7. Toate procedurile care utilizează ochi și corneea de bovine trebuie să respecte reglementările și procedurile aplicabile ale instalației de testare cu privire la manipularea materialelor de origine animală, care includ țesuturile și fluidele tisulare fără a se limita la acestea. Sunt recomandate măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (12).
8. O limitare a metodei de testare este aceea că, în pofida faptului că ia în considerare unele dintre efectele oculare evaluate prin metoda de testare a iritării ochiului de iepure și, într-o anumită măsură, severitatea acestora, nu acordă atenție leziunilor conjunctivale și iridiane. De asemenea, deși reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare BCOP, s-a propus, pe baza studiilor pe ochi de iepure, evaluarea adâncimii inițiale a leziunii corneei pentru a se face o distincție între efectele ireversibile și cele reversibile (13). În sfârșit, metoda de testare BCOP nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.

9. În prezent se depun eforturi pentru a caracteriza utilitatea și limitele de aplicare ale analizei BCOP pentru identificarea substanțelor iritante de intensitate medie și a celor neiritante [a se vedea de asemenea alineatul (45)]. De asemenea, utilizatorii sunt încurajați să furnizeze organizațiilor de validare mostre și/sau date pentru evaluarea oficială a aplicațiilor potențiale ulterioare ale metodei de testare BCOP, inclusiv pentru identificarea substanțelor cu potențial iritant sever și a substanțelor neiritante.
10. Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată prezenta metodă trebuie să utilizeze substanțele de verificare menționate în apendicele 2. Un laborator poate utiliza substanțele chimice respective pentru a-și demonstra performanțele tehnice în ceea ce privește aplicarea metodei de testare BCOP, înainte de trimiterea datelor analizei BCOP în scopul clasificării reglementare a riscurilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Metoda de testare BCOP este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a funcțiilor fiziologice și biochimice normale ale corneei bovine *in vitro*. În această metodă de testare, leziunea provocată de substanța de test este apreciată prin măsurătorile cantitative ale modificărilor opacității și permeabilității corneene cu ajutorul unui opacimetru și, respectiv, al unui spectrofotometru în lumină vizibilă. Ambele măsurători sunt utilizate pentru a calcula IVIS, care este folosit pentru a desemna o categorie de clasificare a riscului de a provoca efecte iritante *in vitro* pentru anticiparea potențialului iritant la nivel ocular *in vivo* al unei substanțe de test (a se vedea criteriile de decizie).
12. Metoda de testare BCOP utilizează corneele izolate de la ochii bovinelor proaspăt sacrificate. Opacitatea corneeană este determinată cantitativ prin măsurarea transmisiei luminii prin corneele. Permeabilitatea este determinată cantitativ prin măsurarea cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate întreaga grosime a corneei, detectat în centrul camerei posterioare. Substanțele de test sunt aplicate la nivelul suprafeței epiteliale a corneei prin adăugare în camera anterioară a suportului corneean. Apendicele 3 prezintă o descriere și o diagramă a unui suport corneean utilizat în analiza BCOP. Suporturile corneene pot fi obținute din surse comerciale diverse sau pot fi confecționate.

Sursa și vârsta ochilor bovini și selectarea speciilor de animale

13. Bovinele trimise la abator sunt sacrificate de obicei pentru consumul uman sau în alte scopuri comerciale. Numai animalele sănătoase, considerate corespunzătoare pentru alimentația umană sunt utilizate ca sursă de corneele pentru BCOP. Deoarece bovinele au o greutate care variază în limite largi în funcție de rasă, vârstă și sex, nu există o greutate recomandată pentru animale în momentul sacrificării.
14. Utilizarea de ochi de la animale de vârste diferite poate conduce la variații ale dimensiunilor corneene. Corneele cu un diametru orizontal > 30,5 mm și valori ale grosimii corneene centrale (*central corneal thickness*-CCT) $\geq 1\ 100\ \mu\text{m}$ sunt obținute în general de la animale cu vârsta de peste opt ani, iar corneele cu diametrul orizontal < 28,5 mm și CCT < 900 μm , de la bovine cu vârsta sub cinci ani (14). Din această cauză, nu se utilizează de obicei ochii de la animale cu vârsta de peste 60 de luni. În mod obișnuit, nu s-au utilizat ochi de la bovine cu vârsta sub 12 luni deoarece, în acest caz, globii oculari sunt în creștere, iar grosimea și diametrul corneei sunt considerabil mai mici decât cele raportate pentru ochii provenind de la animalele mature. Cu toate acestea, utilizarea corneelor de la animale tinere (adică cele cu vârsta cuprinsă între 6 și 12 luni) este permisă deoarece prezintă o serie de avantaje, cum ar fi disponibilitatea sporită, un interval de vârstă mai limitat și riscuri diminuate în ceea ce privește expunerea potențială a lucrătorilor la encefalopatia bovină spongiformă (15). Deoarece evaluarea suplimentară a efectului dimensiunii sau grosimii corneei asupra sensibilității la substanțe corozive sau iritante este valoroasă, utilizatorii sunt încurajați să raporteze vârsta estimativă și/sau greutatea animalelor de la care provin corneele folosite în studiu.

Colectarea și transportul ochilor la laborator

15. Ochii sunt colectați de angajații abatorului. Pentru a reduce la minim lezarea mecanică sau de altă natură a ochilor, aceștia trebuie enucleați cât mai curând posibil după sacrificare. Pentru a preveni expunerea ochilor la substanțe cu potențial iritant, angajații abatorului nu trebuie să utilizeze detergenți la spălarea capului animalului.
16. Ochii trebuie imersați complet în soluție salină echilibrată Hanks (*Hanks' Balanced Salt Solution* - HBSS), într-un recipient cu dimensiuni adecvate, și transportați la laborator într-un mod care să diminueze deteriorarea și/sau contaminarea bacteriană. Deoarece ochii sunt colectați în timpul procesului sacrificării, lucrătorii ar putea fi expuși la sânge sau la alte substanțe biologice, inclusiv bacterii și alte microorganisme. Din acest motiv este important să se asigure reducerea la minim a riscului de contaminare [de exemplu, prin păstrarea în gheață a recipientului care conține ochii, prin adăugarea de antibiotice la HBSS utilizat pentru a păstra ochii în timpul transportului (de exemplu, penicilină în concentrație de 100 UI/ml și streptomycină, 100 $\mu\text{g/ml}$)].
17. Perioada de timp dintre colectarea ochilor și utilizarea corneelor în analiza BCOP trebuie să fie redusă (în mod normal colectate și utilizate în aceeași zi) și trebuie să se demonstreze că nu compromite rezultatele testării. Aceste rezultate au la bază criteriile de selecție a ochilor, precum și răspunsurile de control pozitive și negative. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să aparțină aceluiași grup de ochi și să fie colectați în aceeași zi.

Criterii de selecție pentru ochii utilizați în metoda BCOP

18. În momentul în care ajung la laborator, ochii sunt examinați cu atenție pentru depistarea defectelor, inclusiv a opacității, zgârieturilor și neovascularizării. Numai corneele care provin de la ochi lipsiți de asemenea defecte urmează să fie utilizați.
19. De asemenea, calitatea fiecărei cornee este evaluată în ultimele etape ale analizei. Corneele care au o opacitate mai mare de șapte unități de opacitate (NOTĂ: opacimetrul trebuie calibrat cu standarde care sunt utilizate pentru stabilirea unităților de opacitate, a se vedea appendicele 3) după o perioadă de echilibrare inițială de o oră, urmează să fie îndepărtate.
20. Fiecare grup de tratament (substanță de test, martori pozitivi și negativi testați în paralel) este reprezentat de minim trei ochi. În analiza BCOP trebuie utilizate trei cornee în calitate de cornee martor negativ. Deoarece toate corneele sunt excizate din globul integral și montate în camerele corneene, există posibilitatea producerii de artefacte din cauza manipulării în ceea ce privește valorile opacității corneene individuale și ale permeabilității (inclusiv martorul negativ). În plus, valorile opacității și permeabilității pentru corneele martor negative sunt utilizate pentru a corecta în calculele IVIS valorile permeabilității și opacității corneene ale articolului de test și cele ale martorului pozitiv tratat.

PROCEDURĂ**Pregătirea ochilor**

21. Corneele fără defecte sunt disecate cu menținerea unei margini de 2 până la 3 mm de sclerotică pentru a ajuta la manipularea ulterioară, luându-se precauții pentru a preveni lezarea epitelului și a endoteliului corneei. Corneele izolate sunt montate în suporturi corneene special proiectate care constau din compartimente anterioare și posterioare, care sunt strâns legate de partea epitelială și, respectiv, de partea endotelială a corneei. Ambele camere sunt umplute cu un exces de mediu Eagle esențial minimal (*Eagle's Minimum Essential Medium* - EMEM) preîncălzit (mai întâi camera posterioară), asigurându-se că nu se formează bule. Dispozitivul este apoi echilibrat la $32 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de cel puțin o oră, pentru a permite corneelor să se echilibreze cu mediul și, în măsura în care este posibil, să desfășoare o activitate metabolică normală (temperatura aproximativă a suprafeței corneene *in vivo* este de 32°C).
22. După perioada de echilibrare, în ambele camere se adaugă EMEM proaspăt preîncălzit și sunt efectuate citirile nivelului de bază pentru opacitatea fiecărei cornee. Toate corneele care prezintă leziuni tisulare macroscopice (de exemplu, zgârieturi, pigmentare, neovascularizare) sau o opacitate > 7 unități de opacitate sunt îndepărtate. Se calculează opacitatea medie a tuturor corneelor echilibrate. Cel puțin trei cornee cu valori ale opacității apropiate de valoarea medie a tuturor corneelor sunt selectate drept cornee martor negativ (sau solvent). Corneele rămase sunt distribuite apoi în grupuri de tratament și grupuri martor pozitiv.
23. Deoarece căldura specifică a apei este mai mare decât cea a aerului, cea dintâi asigură condiții de temperatură pentru incubare mai stabile. Prin urmare, se recomandă utilizarea unei băi de apă pentru menținerea suportului cornean și a conținutului acestuia la temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Totuși, se pot utiliza de asemenea incubatoarele cu aer, dacă se iau precauții pentru menținerea stabilității temperaturii (de exemplu, prin preîncălzirea suporturilor și a mediilor).

Aplicarea substanței de test

24. Se utilizează două protocoale de tratament diferite, unul pentru substanțe lichide și agenți tensioactivi (solide sau lichide) și altul pentru substanțe solide lipsite de activitate de suprafață.
25. Substanțele lichide sunt testate în stare nediluată, iar agenții tensioactivi sunt testați la o concentrație de 10 % procente masice pe unitate de volum într-o soluție de clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent cu privire la care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. În mod normal, substanțele semisolide, cremele și cerurile sunt testate în același mod ca și substanțele lichide. Trebuie oferită o justificare adecvată pentru concentrații de diluare alternative. Corneele sunt expuse la substanțe lichide și agenți tensioactivi timp de 10 minute. Utilizarea altor durate de expunere trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată.
26. În mod normal, substanțele solide lipsite de activitate de suprafață sunt testate sub formă de soluții sau suspensii cu o concentrație de 20 % într-o soluție de 0,9 % clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent pentru care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. În anumite circumstanțe și cu o justificare științifică adecvată, și substanțele solide pot fi testate în stare pură prin aplicarea directă pe suprafața corneană prin utilizarea metodei camerei deschise (a se vedea paragraful 29). Corneele sunt expuse substanțelor solide timp de patru ore, dar, la fel ca în cazul lichidelor sau al agenților tensioactivi, pot fi utilizate durate de expunere alternative cu o argumentare științifică corespunzătoare.
27. În funcție de natura fizică și caracteristicile chimice (de exemplu, substanțe solide, lichide, vâscoase, comparativ cu lichide nevâscoase) ale substanței de test, se pot utiliza diferite metode de tratament. Factorul critic asigură faptul că substanța de test acoperă în mod adecvat suprafața epitelială și că este îndepărtată în mod corespunzător în timpul etapelor de spălare. În mod normal, pentru substanțele de test lichide nevâscoase sau ușor vâscoase, se utilizează o metodă cu camera închisă, iar pentru substanțele lichide semivâscoase și vâscoase, precum și pentru substanțele solide pure, se utilizează o metodă cu camera deschisă.

28. În cazul metodei cu camera închisă, prin orificiile de dozare de pe suprafața superioară a camerei se introduce în camera anterioară suficientă substanță de test (750 μ l) pentru a acoperi porțiunea epitelială a corneei, iar orificiile sunt ulterior sigilate cu ajutorul dopurilor camerei în timpul expunerii. Este important să se asigure expunerea fiecărei corneee la o substanță de test pentru perioada de timp adecvată.
29. În cazul metodei cu camera deschisă, inelul de fixare a ferestrei și fereastra de sticlă din camera anterioară sunt îndepărtate înainte de tratament. Substanța martor sau substanța de test (750 μ l, sau substanță de test în cantitate suficientă pentru a acoperi complet corneea) sunt aplicate direct pe suprafața epitelială a corneei cu ajutorul unei micropipete. Dacă o substanță de test este dificil de pipetat, substanța de test poate fi încărcată sub presiune într-o pipetă care funcționează pe principiul dezlocuirii pozitive pentru a ajuta dozarea. Vârful unei astfel de pipete este introdus în vârful de distribuire al seringii astfel încât materialul să poată fi încărcat sub presiune în vârful de dezlocuire. Pistonul seringii este apăsat în timp ce pistonul pipetei este tras în sus. Dacă la nivelul vârfului pipetei apar bule de aer, articolul de test este îndepărtat (expulzat) și procedeul se repetă până când vârful se umple fără a exista bule de aer. Dacă este necesar, se poate utiliza o seringă normală (fără ac) deoarece permite măsurarea unui volum precis de substanță de test și o aplicare mai ușoară la nivelul suprafeței epiteliale a corneei. După dozare, fereastra de sticlă este înlocuită la nivelul camerei anterioare pentru a recrea un sistem închis.

Incubarea post-expunere

30. După perioada de expunere, se îndepărtează din camera anterioară substanța de test, martorul negativ sau martorul pozitiv, iar epiteliul este spălat de cel puțin trei ori (sau până când nu se mai constată vizual prezența substanței de test) cu EMEM (care conține roșu fenol). Pentru spălare se utilizează un mediu care conține roșu fenol deoarece schimbarea de culoare a acestui indicator poate fi monitorizată pentru determinarea eficienței spălării materialelor acide sau alcaline. Corneele sunt spălate de mai mult de trei ori dacă roșul fenol este în continuare decolorat (galben sau purpuriu) sau dacă substanța de test este în continuare vizibilă. După ce mediul nu mai conține substanță de test, corneele sunt spălate pentru ultima dată cu EMEM (fără roșu fenol). EMEM (fără roșu fenol) se utilizează pentru spălarea finală pentru a se asigura îndepărtarea substanței roșu fenol din camera anterioară înainte de măsurarea opacității. Camera anterioară se reumple apoi cu EMEM fără roșu fenol.
31. În cazul lichidelor sau al agenților tensioactivi, după spălare, corneele sunt incubate pentru o perioadă suplimentară de două ore la 32 ± 1 °C. Un interval post-expunere mai lung poate fi util în anumite circumstanțe și necesitatea acestuia va fi examinată de la caz la caz. Corneele tratate cu substanțe solide sunt spălate amănunțit după o perioadă de expunere de patru ore, fără a fi necesară o incubare suplimentară.
32. Opacitatea și permeabilitatea fiecărei corneee se înregistrează la sfârșitul perioadei de incubare post-expunere, în cazul substanțelor lichide și al agenților tensioactivi, și la sfârșitul unei perioade de expunere de patru ore în cazul substanțelor solide lipsite de activitate de suprafață. În plus, fiecare corneee se examinează vizual, înregistrându-se observațiile pertinente (de exemplu, exfolierea țesuturilor, reziduuri de substanță de test, tipare de opacifiere neuniformă). Observațiile respective pot fi importante deoarece se pot reflecta în variații ale citirilor opacimetrului.

Substanțe de control

33. În fiecare experiment sunt incluși martori negativi sau grupuri martor solvenți/eluenți și martori pozitivi testați în paralel.
34. Atunci când se testează o substanță lichidă cu puritate de 100 %, în metoda de testare BCOP se include un martor negativ testat în paralel (de exemplu, soluție de clorură de sodiu 0,9 % sau apă distilată), pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru punctele finale ale analizei. În plus, această metodă garantează faptul că nu va apărea o reacție de iritare din cauza condițiilor de analiză neadecvate.
35. Atunci când se testează o substanță lichidă diluată, un agent tensioactiv, sau o substanță solidă, în metoda de testare BCOP se include un grup martor solvent/eluent pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru punctele finale ale analizei. Se poate utiliza numai un solvent/eluent în legătură cu care există dovezi că nu are efecte adverse asupra sistemului testat.
36. În fiecare experiment se introduce un martor pozitiv constând într-un iritant ocular, pentru a se verifica dacă se produce un răspuns sever. Deoarece analiza BCOP este utilizată în această metodă de testare pentru a identifica substanțele care au un caracter coroziv sau un potențial iritant sever, în mod ideal martorul pozitiv ar trebui să fie o substanță de referință care induce o reacție severă. Totuși, pentru a garanta faptul că există posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției la martorul pozitiv, amplexarea reacției iritante nu trebuie să fie excesiv de mare.
37. Dimetilformamida sau soluția 1 % de hidroxid de sodiu sunt exemple de martori pozitivi pentru substanțele de test lichide. Soluția de imidazol 20 % (procente masice pe unitate de volum) într-o soluție de clorură de sodiu 0,9 % reprezintă un exemplu de martor pozitiv pentru substanțele de test solide.

38. Substanțele etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei clase de substanțe sau de produse, sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

Caracteristici măsurate

39. Opacitatea se determină prin măsurarea luminii transmise prin corneea. Opacitatea corneeană este măsurată cantitativ cu ajutorul unui opacimetru, conducând la valori ale opacității măsurate pe o scară continuă.
40. Permeabilitatea este determinată prin măsurarea cantitativă a fluoresceinei sodice care străbate toate straturile celulare corneene (de exemplu, epiteliul de pe suprafața exterioră a corneei prin endoteliul de pe suprafața interioară a corneei). Un ml de soluție de fluoresceină sodică (4 sau 5 mg/ml atunci când se testează substanțe lichide și agenți tensioactivi sau, respectiv, substanțe solide lipsite de activitate de suprafață) se adaugă în camera anterioară a suportului cornean, care se leagă strâns cu porțiunea epitelială a corneei, iar camera posterioară, care se leagă strâns cu porțiunea endotelială a corneei, este umplută cu EMEM proaspăt. Suportul este apoi incubat în poziție orizontală timp de 90 ± 5 min la 32 ± 1 °C. Cantitatea de fluoresceină sodică care pătrunde în camera posterioară este măsurată cantitativ cu ajutorul unui spectrofotometru UV/VIS. Măsurătorile spectrofotometrice efectuate la 490 nm sunt înregistrate sub formă de valori ale densității optice (DO_{490}) sau ale absorbanței, care sunt măsurate pe o scară continuă. Valorile permeabilității fluoresceinei sunt determinate prin utilizarea valorilor DO_{490} înregistrate de un spectrofotometru în lumină vizibilă care folosește valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei.
41. Ca o variantă alternativă, se poate utiliza un cititor de plăci cu 96 de godeuri cu microtitrare cu condiția: (i) să se poată stabili domeniul linear al cititorului de plăci pentru determinarea valorilor DO_{490} a fluoresceinei; și (ii) să se utilizeze volumul corect de mostre de fluoresceină în placa cu 96 de godeuri pentru a se obține valori ale DO_{490} echivalente cu valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei [acest aspect ar putea necesita un godeu umplut complet (în mod obișnuit 360 μl)].

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

42. După corectarea valorilor opacității și ale permeabilității medii (DO_{490}) pentru valorile opacității de fundal și a permeabilității matorului negativ DO_{490} , valorile medii ale opacității și ale permeabilității DO_{490} pentru fiecare grup de tratament trebuie combinate într-o formulă dedusă în mod empiric pentru a calcula un scor de evaluare a efectelor iritante *in vitro* (*in vitro irritancy score* - IVIS) pentru fiecare grup de tratament după cum urmează:

$$\text{IVIS} = \text{valoarea opacității medii} + (15 \times \text{valoarea permeabilității medii } DO_{490})$$

Sina *et al.* (16) au raportat că această formulă a fost dedusă în urma unor studii interne și a studiilor realizate prin colaborarea mai multor laboratoare. Datele generate pentru o serie de 36 de compuși într-un studiu inter-laboratoare au fost supuse unei analize multivariante pentru a determina ecuația cea mai potrivită pentru datele *in vivo* și cele *in vitro*. Analiza a fost efectuată de cercetători de la două companii diferite, care au obținut ecuații aproape identice.

43. Valorile opacității și permeabilității trebuie de asemenea evaluate independent pentru a determina, prin utilizarea doar a uneia dintre cele două caracteristici (a se vedea criteriile de decizie), dacă o substanță de test a provocat corозиunea sau iritarea severă.

Criterii de decizie

44. O substanță care provoacă o valoare a IVIS $\geq 55,1$ este definită ca fiind corozivă sau având un potențial iritant sever. Astfel cum s-a arătat la punctul 1, dacă substanța de test nu este identificată drept substanță cu caracter coroziv sau cu potențial iritant sever la nivel ocular, trebuie efectuate testări suplimentare în scopul clasificării și etichetării. Prin comparație cu datele metodei de testare *in vivo* pe ochi de iepure, clasate în conformitate cu sistemele de clasificare EPA (1), UE (2) sau GHS (3), metoda de testare BCOP are o precizie totală cuprinsă între 79 % (113/143) și 81 % (119/147), o rată de rezultate fals pozitive cuprinsă între 19 % (20/103) și 21 % (22/103), și o rată de rezultate fals negative cuprinsă între 16 % (7/43) și 25 % (10/40). Atunci când din baza de date sunt excluse substanțe din anumite clase chimice (de exemplu, alcoolii, cetone) sau fizice (de exemplu, substanțe solide), precizia metodei BCOP raportată la sistemele de clasificare UE, EPA și GHS este cuprinsă între 87 % (72/83) și 92 % (78/85), rata de rezultate fals pozitive este cuprinsă între 12 % (7/58) și 16 % (9/56), iar rata de rezultate fals negative între 0 % (0/27) și 12 % (3/26).
45. Chiar dacă pentru o substanță de test nu se obține încadrarea în clasa substanțelor având caracter coroziv sau potențial iritant sever, datele BCOP pot fi utile coroborate cu datele de testare obținute prin testul *in vivo* pe ochi de iepure sau printr-o testare *in vitro* validată în mod corespunzător, pentru a evalua în continuare utilitatea și limitele de aplicare ale metodei de testare BCOP în ceea ce privește identificarea substanțelor având un potențial iritant redus și a celor neiritante (sunt în curs de elaborare linii directoare privind utilizarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare).

Criterii de acceptare a studiului

46. Un test este considerat acceptabil dacă pentru martorul pozitiv se obține o valoare a IVIS cuprinsă în intervalul reprezentat de două deviații standard ale mediei istorice actuale, care trebuie actualizată la fiecare trei luni, sau de fiecare dată când un test care poate fi acceptat este efectuat în laboratoare în care testele sunt realizate rar (adică mai puțin de o dată pe lună). Reacțiile negative sau cele ale grupului martor solvent/eluent trebuie să conducă la valori ale opacității și permeabilității care sunt mai mici decât limitele superioare stabilite ale valorilor opacității și permeabilității fundalului pentru corneele de bovine tratate cu martorii negativi sau cu grupurile martor solvent/eluent respective.

Raport de testare

47. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

Substanțe testate și de control

Denumire (denumiri) chimică (chimice), precum denumirea structurală utilizată de *Chemical Abstracts Service* (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;

Numărul de înregistrare (*Registry Number -RN*) CAS, dacă se cunoaște;

Puritatea și compoziția substanței sau a amestecului [în procent(e) de greutate], în măsura în care informația respectivă este disponibilă;

Proprietăți fizico-chimice, precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;

Tratamentul substanțelor testate/de control înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

Stabilitatea, dacă se cunoaște.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

Numele și adresa sponsorului, a instalației de testare și a directorului de studiu;

Identificarea sursei ochilor (și anume întreprinderea unde au fost colectați);

Condițiile de depozitare și transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp până la începerea testării, mediile de transport și condițiile de temperatură, toate antibioticele utilizate);

Dacă sunt disponibile, caracteristicile specifice ale animalelor de la care au fost colectați ochii (de exemplu, vârsta, sexul, greutatea animalului donator).

*Justificarea metodei de testare și a protocolului utilizat**Integritatea metodei de testare*

Procedura utilizată pentru a asigura integritatea în timp (și anume, precizia și fiabilitatea) a metodei de testare (de exemplu, testarea periodică a substanțelor de verificare, utilizarea datelor istorice de control negative și pozitive).

Criteriile pentru un test acceptabil

Domenii acceptabile pentru martorii pozitivi și negativi testați în paralel pe baza datelor istorice;

După caz, domenii pentru martorii etalon acceptabili testați în paralel pe baza datelor istorice.

Condiții de testare

Descrierea sistemului de testare utilizat;

Tipul de suport cornean utilizat;

Informații privind calibrarea pentru dispozitivele utilizate pentru măsurarea opacității și a permeabilității (de exemplu, opacimetru și spectrofotometru);

Informații privind corneele bovine utilizate, inclusiv specificații privind calitatea acestora;

Detalii privind procedura de testare utilizată,

Concentrația (concentrațiile) substanței de test utilizate;

Descrierea tuturor modificărilor procedurii de testare;

Trimiteri la datele istorice ale modelului (de exemplu, martori negativi și pozitivi, substanțe de verificare, substanțe etalon);

Descrierea criteriilor de evaluare folosite.

Rezultate

Prezentarea sub formă de tabel a rezultatelor obținute cu fiecare mostră de testare [de exemplu, valorile opacității și ale DO₄₉₀ precum și IVIS calculat pentru substanța de test și martorii pozitivi negativi și etalon (dacă se includ), raportate sub formă de tabel, inclusiv datele de la reproducere repetă experimentele după caz, și mediile \pm deviația standard pentru fiecare experiment];

Descrierea altor efecte observate.

Discutarea rezultatelor

Concluzie

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

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

- (2) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006. JO L 353, 31.12.2008 p. 1.

- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - GHS (*Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice*): Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Disponibil la:

[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. Document disponibil la adresa:

[<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. Document disponibil la adresa:

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

- (6) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei. JO L 396, 30.12.2006, p. 1.

- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Document disponibil la adresa:

[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. Document disponibil la adresa:
- [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. Document disponibil la adresa:
- [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. Document disponibil la adresa:
- [<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. Document disponibil la adresa:
- [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. Document disponibil la adresa:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță etalon: O substanță utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date de susținere privind efecte cunoscute și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Cornee: Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

Opacitate corneană: Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță de test. Opacitatea corneană crescută este un indicator al unei leziuni a corneei. Opacitatea poate fi evaluată în mod subiectiv, astfel cum se procedează în cazul testului Draize pe ochi de iepure, sau în mod obiectiv, cu ajutorul unui instrument cum este „opacimetrul”.

Permeabilitatea corneană: Măsurarea cantitativă a lezării epitelului cornean printr-o determinare a cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate toate straturile celulare ale corneei.

Categoria EPA 1: Caracter coroziv (distrugerea ireversibilă a țesutului ocular) sau afectare a corneei sau iritație care persistă mai mult de 21 de zile (1).

Categoria UE R41: Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (2).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de riscuri fizice, riscuri pentru sănătate și riscuri pentru mediu, și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, fraze de pericol, fraze de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (3).

Categoria HS 1: Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (3).

Risc: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, sistem sau (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Scor de evaluare a efectelor iritante in vitro (IVIS): O formulă dedusă în mod empiric utilizată în analiza BCOP în care valorile opacității medii și cele ale permeabilității medii pentru fiecare grup de tratament sunt combinate într-un scor in vitro unic pentru fiecare grup de tratament. $IVIS = \text{valoarea opacității medii} + (15 \times \text{valoarea permeabilității medii})$.

Martor negativ: O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului testat. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanță de test și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul testat.

Substanță neiritantă: Substanțe care nu sunt încadrate în categoriile EPA I, II, sau III, în categoriile UE R41 sau R36; sau categoria GHS 1, 2A, sau 2B de iritanți oculari.

Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular: (a) Substanță care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivelul ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

Iritant ocular: (a) Substanță care produce o modificare reversibilă la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria EPA II sau III, categoria UE R36, sau categoria GHS 2A sau 2B de iritanți oculari (1) (2) (3).

Substanță cu potențial iritant sever: (a) O substanță care provoacă lezarea tisulară la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului, care nu se vindecă în 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o slăbire fizică severă a vederii; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

Opacimetru: Instrument utilizat pentru a măsura „opacitatea corneană” prin evaluarea cantitativă a transmisiei luminii prin corneă. Instrumentul tipic are două compartimente, fiecare dintre acestea fiind dotat cu propria sursă de lumină și propria celulă fotoelectrică. Unul dintre compartimente este utilizat pentru corneea tratată, iar cel de-al doilea servește pentru a calibra și a regla punctul de zero al instrumentului. Lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele între lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și se afișează valoarea numerică a opacității pe un ecran digital.

Controlul pozitiv: O probă replică conținând toate componentele sistemului testat și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

Martor solvent/eluent: O probă netratată care conține toate componentele sistemului testat, inclusiv solventul sau eluentul, care este analizată împreună cu probele tratate cu substanță de test și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța de test dizolvată în același solvent sau eluent. În plus, atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică dacă solventul sau eluentul interacționează cu sistemul testat.

Testare secvențială: O strategie de testare în trepte în cadrul căreia sunt revizuite toate informațiile existente privind o substanță de test, într-o anumită ordine, utilizând un proces de evaluare a forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscului, înainte de a trece la etapa următoare. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se execută o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate face o clasificare lipsită de echivoc.

Metodă de testare validată: Metodă de testare în legătură cu care studiile de validare au fost încheiate în scopul determinării relevanței (inclusiv precizia) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

Forța probantă: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a ajunge la o concluzie în ceea ce privește riscul potențial al unei substanțe și a susține concluzia respectivă.

Apendicele 2

Substanțe de verificare pentru metoda de testare BCOP

Înainte de utilizarea sistematică a unei metode de testare conforme cu prezenta metodă de testare, este posibil ca laboratoarele să dorească să demonstreze performanțele tehnice proprii, prin identificarea corectă a clasificării caracterului coroziv pentru cele 10 substanțe recomandate în tabelul 1. Substanțele au fost selectate pentru a reprezenta domeniul de reacții pentru iritația/coroziunea locală la nivelul ochilor, care se bazează pe rezultatele testului *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405), și anume, categoriile 1, 2A, 2B, sau neclasificat și etichetat în conformitate cu GHS al Națiunilor Unite) (3) (7). Totuși, ținând cont de utilitatea validată a acestor analize (și anume, în scopul de a identifica numai substanțele care au caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), există numai două rezultate ale testelor destinate clasificării (coroziv/iritant sever sau necoroziv/fără potențial iritant sever) pentru a demonstra performanțele. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile comercial, să fie disponibile informații de referință *in vivo* de calitate superioară și să existe date de calitate furnizate de două metode *in vitro* pentru indicațiile orientative de testare care se elaborează. Din acest motiv, substanțele iritante au fost selectate din lista recomandată ICCVAM care cuprinde 122 substanțe de referință pentru validarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare (a se vedea Apendicele H: Substanțe de referință recomandate ICCVAM) (5). Informațiile de referință sunt disponibile în documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metodele de testare a BCOP și a ochiului izolat de pui (*Isolated Chicken Eye* - ICE) (17) (18).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda BCOP

Substanță	CAS RN	Clasă chimică ⁽¹⁾	Formă fizică:	Clasificare in vivo ⁽²⁾	Clasificare in vitro ⁽³⁾
Clorură de benzalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Clorhexidină	55-56-1	Amină, amidină	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Acid dibenzoil-L-tartric	2743-38-6	Acid carboxilic, ester	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Imidazol	288-32-4	Heterociclu	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Acid tricloracetic (30 %)	76-03-9	Acid carboxilic	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Clorură de 2,6-diclor-benzoil	4659-45-4	Halogenură de acil	Lichid	Categoria 2A	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Etil-2-metil-acetoacetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2B	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Azotat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2A	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Glicerol	56-81-5	Alcool	Lichid	Neetichetat	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
n-Hexan	110-54-3	Hidrocarbură (aciclică)	Lichid	Neetichetat	Necoroziv/Fără potențial iritant sever

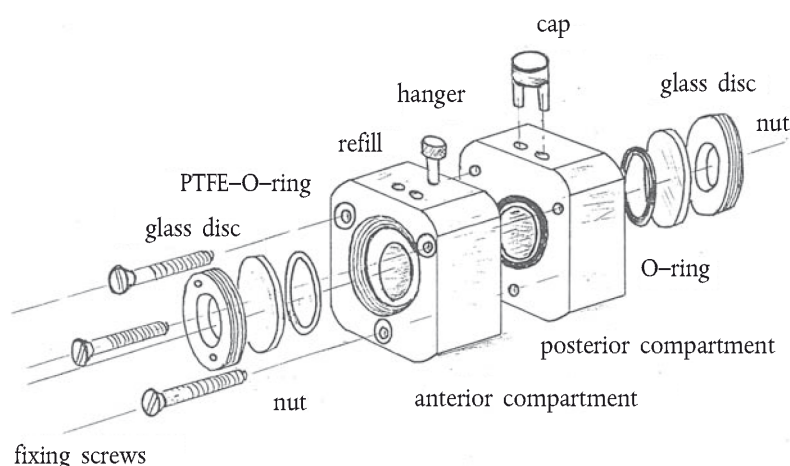
Prescurtări: Nr. CASRN = Număr de înregistrare al *Chemical Abstracts Service*.⁽¹⁾ Clasele chimice sunt desemnate pentru fiecare substanță de test prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Pe baza rezultatelor furnizate de testul in vivo pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS a Națiunilor Unite (3)(7).⁽³⁾ Pe baza rezultatelor obținute prin analizele BCOP și ICE.

Apendicele 3

SUPPORT CORNEAN BCOP

1. Suporturile corneene BCOP sunt confecționate dintr-un material inert (de exemplu, polipropilenă). Suporturile sunt formate din două jumătăți (o cameră anterioară și una posterioară) și au două camere cilindrice interne similare. Fiecare cameră are un volum de 5 ml și conține la capăt un geam din sticlă, prin care se observă și se înregistrează opacitatea. Camerele interne au un diametru de 1,7 cm și o adâncime de 2,2 cm ⁽¹⁾. Eventualele scurgeri sunt prevenite cu ajutorul unei garnituri amplasate în camera posterioară. Corneele se plasează cu partea endotelială pe garnitura camerei posterioare, iar camerele interioare se plasează pe partea epitelială a corneelor. Camerele sunt fixate cu trei șuruburi din oțel inoxidabil aflate pe muchiile exterioare ale camerei. La capătul fiecărei camere se află un geam de sticlă amovibil, care permite accesul facil la cornee. De asemenea, se plasează o garnitură între geamul de sticlă și cameră pentru prevenirea scurgerilor. Două orificii situate în partea superioară a fiecăreia din cele două camere permit introducerea și îndepărtarea mediului și compușilor de testare. Aceste orificii sunt închise cu capace de cauciuc pe perioadele de tratament și de incubare.

⁽¹⁾ Dimensiunile indicate se referă la un suport cornean utilizat pentru bovine a căror vârstă variază între 12 și 60 de luni. În cazul în care se folosesc animale cu vârsta cuprinsă între 6-12 luni, suportul trebuie să fie proiectat astfel încât volumul fiecărei camere să fie de 4 ml, iar fiecare dintre camerele interioare să aibă un diametru de 1,5 cm și o adâncime de 2,2 cm. Este foarte important ca raportul între suprafața zonei corneene expuse și volumul camerei posterioare a suporturilor corneene noi să fie identic cu raportul existent în cazul suportului cornean tradițional. Acest lucru este necesar pentru determinarea corectă a valorilor permeabilității, în scopul calculării IVIS prin formula propusă.



Glosar

Glass disc: Disc de sticlă

PTFE-O-ring: Garnitură PTFE

Refill: Orificiu de umplere

Hanger: Cârlig

Cap: Capac

Nut: Șaibă

O-ring: Garnitură

Posterior compartment: Compartimentul posterior

Anterior compartment: Compartimentul anterior

Fixing screws: Șuruburi de fixare

OPACIMETRUL

2. Opacimetrul este un dispozitiv de măsurare a transmisiei luminii. Lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele între lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și se afișează valoarea numerică a opacității pe un ecran digital. Se stabilesc unitățile de opacitate.
3. Opacimetrul trebuie să asigure un răspuns linear, aflat într-un interval de valori ale opacității corespunzătoare limitelor utilizate pentru diferitele clasificări prevăzute în modelul de predicție (de exemplu, până la limitele care provoacă coroziune/iritație severă). Pentru obținerea unor valori lineare și precise de până la 75-80 unități de opacitate, este necesară calibrarea opacimetrului cu ajutorul unor dispozitive etalon. Se introduc dispozitive etalon (foi opace de poliester) în camera de calibrare (o cameră corneană proiectată să conțină dispozitivele de calibrare) și se citesc valorile indicate de opacimetru. Camera de calibrare este proiectată astfel încât dispozitivele etalon sunt plasate la aproximativ aceeași distanță între sursa de lumină și celula fotoelectrică la care vor fi plasate corneele pe durata măsurării opacității. Mai întâi, opacimetrul este calibrat la 0 unități de opacitate, când în camera de calibrare nu este introdus niciun dispozitiv etalon. După aceasta, se plasează pe rând trei dispozitive etalon diferite în camera de calibrare și se măsoară opacitatea în fiecare caz. Dispozitivele etalon nr. 1, 2 și 3 trebuie să conducă la valori ale opacității egale cu valorile predeterminate de 75, 150 și, respectiv, 225 unități de opacitate, cu o variație de $\pm 5\%$.

METODA B 48 DE TESTARE A OCHIULUI IZOLAT DE PUI PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV ȘI UN POTENȚIAL IRITANT SEVER LA NIVEL OCULAR**INTRODUCERE**

1. Metoda de testare a ochiului izolat de pui (ICE) este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite cazuri și cu anumite limite, în vederea clasificării unor substanțe și amestecuri ca fiind substanțe care au un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular (1) (2) (3). În scopul prezentei metode de testare, substanțele cu potențial iritant sever sunt iritanții a căror acțiune provoacă leziuni oculare care persistă la iepure timp de cel puțin 21 de zile după administrare. Chiar dacă nu este considerată adecvată pentru a substitui în întregime testul *in vivo* pe ochi de iepure, metoda ICE este recomandată pentru a fi inclusă într-o strategie de testare secvențială privind clasificarea și etichetarea reglementară într-un domeniu de aplicabilitate specific (4) (5). Substanțele și amestecurile de testare (6) care se dovedesc pozitive după această evaluare pot fi clasificate ca fiind substanțe care au un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular, fără a mai fi necesară testarea pe iepuri. O substanță al cărei rezultat este negativ va trebui să fie testată pe iepuri prin intermediul unei strategii de testare secvențiale, astfel cum este descris în orientarea OCDE privind testarea nr. 405 (7) (capitolul B.5 din prezenta anexă).
2. Scopul prezentei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua caracterul coroziv sau sever iritant al unei substanțe de încercare, măsurat prin capacitatea acesteia de a induce toxicitate într-un ochi enucleat de pui. Efectele toxice asupra corneei sunt măsurate prin (i) o evaluare calitativă a opacității, (ii) o evaluare calitativă a leziunilor epitelului prin aplicarea de fluoresceină în ochi (retenția fluoresceinei), (iii) o măsurare cantitativă a creșterii grosimii (inflamare), și (iv) o evaluare calitativă a leziunilor morfologice macroscopice a suprafeței. Opacitatea, inflamarea și evaluarea leziunilor corneei după expunerea la o substanță de test se stabilesc în mod individual, apoi rezultatele se combină pentru a se obține un coeficient de iritare oculară.
3. Metoda de testare ICE a mai fost utilizată pentru testarea unor substanțe cu potențial iritant la nivel ocular, care provoacă leziuni care se vindecă în mai puțin de 21 de zile, și a unor substanțe neiritante. Totuși, precizia și fiabilitatea metodei de încercare ICE privind substanțele din aceste categorii nu au fost deocamdată evaluate în mod oficial.
4. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII ÎNȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

5. Această metodă de testare are la bază protocolul de testare ICE al Comitetului de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative (ICCVAM) (8), elaborat în urma unui studiu internațional de validare (4) (5) (9) la care au contribuit Centrul european pentru validarea metodelor alternative, Centrul japonez pentru validarea metodelor alternative și Departamentul TNO pentru calitatea vieții, toxicologie și farmacologie aplicată (Țările de Jos). Protocolul a fost întocmit pe baza informațiilor conținute în protocoalele publicate și în protocolul utilizat în prezent de către TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. Limitele de aplicare cunoscute ale acestei metode se referă la rata de rezultate fals pozitive privind alcoolii și ratele de rezultate fals negative privind substanțele solide și agenții tensioactivi (a se vedea punctul 47) (4). Atunci când substanțele din aceste clase chimice și fizice sunt eliminate din baza de date, precizia ICE în funcție de sistemele de clasificare ale UE, EPA și SGA este substanțial ameliorată (4). Având în vedere scopul acestei evaluări (identificarea doar a corozivilor/iritanților severi la nivel ocular), ratele de rezultate fals negative nu sunt foarte mari, deoarece substanțele de acest tip vor fi testate ulterior pe iepuri sau utilizate în cadrul altor teste *in vitro* validate corespunzător, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențială, printr-o abordare având la bază forța probantă a datelor. În plus, baza de date actuală privind validările nu a permis o evaluare adecvată a unor clase chimice sau de produse (de exemplu, amestecurile). Totuși, inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode pentru testarea tuturor tipurilor de materiale (inclusiv amestecuri), în urma căreia un rezultat pozitiv ar putea fi acceptat ca indicator al unei reacții oculare corozive sau sever iritante. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor trebuie interpretate cu prudență, având în vedere riscul de producere a unor prognostice imprecise.
7. Toate procedurile efectuate pe ochi de pui trebuie să respecte regulamentele și normele de manipulare a materialelor de origine umană sau animală, precum țesuturi și lichide tisulare, fără a se limita la acestea. Sunt recomandate măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (15).
8. O limitare a metodei de testare este aceea că, în ciuda faptului că ia în considerare unele dintre efectele oculare evaluate prin metoda de testare a iritării ochiului de iepure și, într-o anumită măsură, severitatea acestora, nu acordă atenție leziunilor conjunctivale și iridiane. De asemenea, deși reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare ICE, s-a propus, pe baza studiilor pe ochi de iepure, evaluarea adâncimii inițiale a leziunii corneei pentru a se face o distincție între efectele ireversibile și cele reversibile (16). În sfârșit, metoda de testare ICE nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.
9. Se depun eforturi permanente de continuare a caracterizării utilității și limitelor metodei de testare ICE de identificare a substanțelor iritante de intensitate medie și a celor neiritante (a se vedea și punctul 48). De asemenea, utilizatorii sunt încurajați să furnizeze specimene și/sau informații către organizațiile de validare, în vederea unei evaluări formale a posibilităților utilizării viitoare ale metodei de testare ICE, care pot consta inclusiv în identificarea substanțelor iritante de intensitate medie și a celor neiritante.

10. Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată prezenta metodă trebuie să utilizeze substanțele de verificare menționate în apendicele 2. Un laborator poate utiliza substanțele chimice respective pentru a-și demonstra competența tehnică în ceea ce privește aplicarea metodei de testare ICE înainte de a transmite datele analizei ICE în scopul clasificării reglementare a riscurilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Metoda de testare ICE este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a funcțiilor fiziologice și biochimice normale a corneei de pui *in vitro*. În prezenta metodă de testare, leziunile provocate de substanța de testare sunt evaluate în funcție de inflamarea corneană, opacitate și retenția fluoresceinei. În timp ce ultimii doi parametri presupun o evaluare calitativă, analiza inflamării corneene asigură o evaluare cantitativă. Fiecare măsurare este transformată într-un scor cantitativ utilizat pentru a se calcula un indice general de iritare sau primește un indice calitativ utilizat pentru a desemna un grad al corozivității oculare și al iritării severe. Oricare dintre aceste două rezultate poate fi utilizat ulterior pentru a prognoasta corozivitatea oculară *in vivo* și potențialul sever de iritare al unei substanțe de testare (a se vedea criteriile de decizie).

Sursa și vârsta ochilor de pui

12. Până în prezent, pentru această evaluare au fost utilizați ochi colectați de la pui sacrificați în abatoare pentru consumul uman, nefiind necesare animale de laborator. Sunt utilizați exclusiv ochi proveniți de la animale considerate adecvate pentru consumul uman.
13. Chiar dacă nu a fost efectuat un studiu controlat de evaluare a vârstei optime a puilor, vârsta și greutatea puilor utilizați până în prezent pentru acest test sunt cele ale puilor de primăvară prelucrați de obicei de un abator (aproximativ 7 săptămâni, 1,5 – 2,5 kg).

Colectarea și transportul ochilor la laborator

14. Capetele se îndepărtează imediat după sedarea puilor (de obicei, prin șoc electric) și incizia la nivelul gâtului pentru scurgerea sângelui. Se recomandă identificarea unei ferme de pui aflate în apropierea laboratorului, astfel încât capetele să fie transferate de la abator către laborator într-un timp suficient de scurt pentru a reduce riscul de deteriorare și/sau contaminare bacteriană. Perioada de timp dintre colectarea capetelor și utilizarea ochilor în metoda de testare ICE trebuie să fie redusă (în mod normal, se încadrează în 2 ore) și trebuie să se demonstreze că nu compromise rezultatele testării. Aceste rezultate au la bază criteriile de selecție a ochilor, precum și răspunsurile de control pozitive și negative. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să aparțină aceluiași grup de ochi și să fie colectați în aceeași zi.
15. Deoarece ochii sunt disecați în laborator, capetele se transportă intacte de la abator, la temperatură ambiantă, în cutii de plastic, și se mențin umede cu prosoape înmuiate în soluție salină izotonică.

Criterii de selecție pentru ochii utilizați în metoda ICE

16. Sunt respinși ochii care, după enucleare, prezintă un nivel de bază ridicat al colorării cu fluoresceină (de exemplu, peste 0,5) sau opacitate corneană (de exemplu, peste 0,5).
17. Fiecare grup de testare și martor pozitiv este format din cel puțin trei ochi. Grupul martor negativ sau proba solvent (dacă se folosește un solvent diferit de soluția salină) constă din cel puțin un ochi.

PROCEDURĂ

Pregătirea ochilor

18. Pleoapele sunt excizate cu atenție, astfel încât să nu se lezeze corneea. Integritatea corneană este evaluată rapid cu ajutorul unei picături de soluție de fluoresceină de sodiu 2 % (procente masice pe unitate de volum) aplicată pe suprafața corneană timp de câteva secunde, care apoi se clătește cu soluție salină izotonică. Ochii tratați cu fluoresceină sunt apoi examinați cu un microscop oftalmologic, urmărindu-se eventualele leziuni ale corneei (cum ar fi valori ale retenției fluoresceinei și opacității corneene de maximum 0,5).
19. Dacă nu prezintă leziuni, ochiul este îndepărtat din orbită cu atenție, astfel încât corneea să nu fie lezată. Globul ocular este scos din orbită prin fixarea membranei nictitante cu ajutorul unui forceps chirurgical, apoi mușchii oculari se taie cu un foarfece îndoit, cu vârf bont. Este important să se evite lezarea corneei (leziuni de compresie) ca urmare a unei presări excesive.
20. Atunci când ochiul este îndepărtat din orbită, se păstrează atașată o porțiune vizibilă a nervului optic. După îndepărtarea din orbită, ochiul este plasat pe o suprafață absorbantă, iar membrana nictitantă și alte țesuturi conjunctive sunt eliminate.

21. Ochiul enucleat este prins cu o clemă din oțel inoxidabil, cu corneea poziționată vertical. Cleva este introdusă apoi într-o cameră a aparatului de suprafuziune (16). Cleva sunt apoi introduse în aparatul de suprafuziune astfel încât corneea să fie irigată cu soluție izotonică. Temperatura camerelor aparatului de suprafuziune trebuie menținută la $32 \pm 1,5$ °C. În apendicele 3 se prezintă o diagramă a aparatului tipic de suprafuziune și a clevelor pentru ochi, care pot achiziționate din comerț sau confecționate. Aparatul poate fi modificat pentru a respecta cerințele din anumite laboratoare (de exemplu, pentru un număr de ochi diferit).
22. După ce au fost introduși în aparatul de suprafuziune, ochii sunt examinați din nou cu un microscop oftalmologic pentru eventuale leziuni apărute în timpul procedurii de disecție. În acest moment, se măsoară grosimea corneei în vârful său, cu ajutorul dispozitivului de măsurare a adâncimii atașat microscopului oftalmologic. Ochii care prezintă: (i) un coeficient al retenției de fluoresceină de peste 0,5; (ii) opacitate corneeană de peste 0,5; sau (iii) orice semne suplimentare de leziuni, se înlocuiesc. În cazul ochilor care nu sunt respinși pe baza acestor criterii, se exclud ochii cu o grosime a corneei care deviază cu peste 10 % de la valoarea medie a tuturor ochilor. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că microscopul oftalmologic pot produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită. Această lărgime se stabilește la 0,095 mm.
23. După examinarea și acceptarea ochilor, aceștia sunt incubati timp de aproximativ 45-60 minute pentru a fi echilibrați cu sistemul de testare anterior dozării. După perioada de echilibrare, se înregistrează o valoare de referință 0 a grosimii și opacității corneei, care va fi utilizată ca valoare de bază (de exemplu, momentul de timp egal cu 0). Cantitatea de fluoresceină determinată în momentul disecției este utilizată ca valoare de referință măsurată pentru acea caracteristică.

Aplicarea substanței de test

24. Imediat după măsurarea valorii de referință 0, ochiul (aflat în suportul său) este extras din aparatul de suprafuziune și plasat într-o poziție orizontală, iar pe corneă se aplică substanța de test.
25. De obicei, substanțele de test lichide se testează nediluate, dar pot fi diluate dacă se consideră necesar (de exemplu, în cadrul elaborării testelor). Solventul preferat pentru substanțele diluate este serul fiziologic. Totuși, în condiții controlate pot fi utilizați solvenți alternativi, dar oportunitatea solvenților diferiți de serul fiziologic nu a fost demonstrată.
26. Substanțele de test lichide se aplică pe corneă astfel încât întreaga suprafață a acesteia să fie acoperită uniform cu substanța de test; volumul standard este de 0,03 ml.
27. Dacă este posibil, substanțele solide se macină cât mai fin posibil cu ajutorul unui mojar cu pistil sau al unui instrument de măcinat comparabil. Pulberea se aplică pe corneă astfel încât suprafața să fie acoperită uniform cu substanța de test; cantitatea standard este de 0,03 g.
28. Substanța de test (lichidă sau solidă) se aplică timp de 10 secunde, după care ochiul se clătește cu soluție salină izotonică (aproximativ 20 ml) la temperatura camerei. După aceasta, ochiul (în suportul său) este reintrodus în aparatul de suprafuziune, în poziția verticală inițială.

Substanțe de control

29. În fiecare experiment se introduc martori negativi sau martori eluenți și martori pozitivi.
30. Atunci când se testează substanțe lichide 100 % sau substanțe solide prin metoda de testare ICE, se utilizează ser fiziologic ca martor negativ pentru a se detecta modificări nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare.
31. Atunci când sunt testate substanțe lichide diluate, metoda de testare prevede un grup de martori solvenți/eluenți prin care se detectează modificările nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare. Conform punctului 25, se poate utiliza doar un solvent/eluent care nu afectează în mod negativ sistemul de încercare.

32. În fiecare experiment se introduce un martor pozitiv constând într-un iritant ocular, pentru a se verifica dacă se produce un răspuns sever. Deoarece în această metodă de testare se utilizează testarea de tip ICE pentru a se identifica corozivii sau iritanții severi, martorul control trebuie să fie o substanță de referință care provoacă un răspuns sever în cadrul acestei metode de testare. Totuși, pentru a fi posibilă evaluarea variabilității răspunsului martorului pozitiv în funcție de timp, dimensiunea răspunsului sever nu trebuie să fie excesiv de mare. Este necesar să fie generate suficiente date *in vitro* pentru martorul pozitiv, astfel încât să poată fi calculat un interval statistic acceptabil pentru acesta. Dacă nu sunt disponibile date adecvate precedente privind metoda de testare ICE pentru un anumit martor pozitiv, pot fi necesare studii pentru obținerea acestora.
33. Acidul acetic 10 % sau clorura de benzaconiu 5 % sunt exemple de martori pozitivi pentru substanțele de test lichide, iar hidroxidul de sodiu sau imidazolul sunt exemple de martori pozitivi pentru substanțe de testare solide.
34. Substanțele etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei clase de substanțe sau de produse, sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

Caracteristici măsurate

35. Corneele tratate sunt evaluate înainte tratamentului și la 30, 75, 120, 180, și 240 minute (± 5 minute) după spălarea post-tratament. Aceste momente de observare permit un număr adecvat de măsurători pe parcursul celor patru ore de tratament, lăsând un interval suficient între măsurători pentru efectuarea observațiilor necesare la nivelul tuturor ochilor.
36. Caracteristicile evaluate sunt opacitatea corneană, inflamarea, retenția de fluoresceină și efectele morfologice (de exemplu, corodarea sau detașarea epitelului). Cu excepția retenției de fluoresceină (determinată numai înainte de tratament și la 30 de minute după expunerea la substanța de test), toate caracteristicile se determină în fiecare din momentele de observare menționate mai sus.
37. Se recomandă realizarea de fotografii pentru documentarea privind opacitatea corneană, retenția de fluoresceină, efectele morfologice și, dacă s-au efectuat, studiile histopatologice.
38. După examinarea finală la un interval de patru ore, utilizatorii sunt încurajați să păstreze ochii într-un fixator adecvat (de exemplu, formol neutru tamponat), pentru o potențială investigare histopatologică.
39. Inflamarea corneană se determină prin măsurarea grosimii corneene efectuată cu ajutorul unui pahimetru optic, atașat unui microscop oftalmologic. Aceasta se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor grosimii corneene conform formulei următoare:

$$\left(\frac{\text{grosimea corneana la momentul } t - \text{grosimea corneana la momentul } = 0}{\text{grosimea corneana la momentul } = 0} \right) \times 100$$

40. Valoarea procentuală medie a inflamării corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului maxim mediu al inflamării corneene, obținut în oricare din momentele de observare, se furnizează apoi un punctaj general al categoriei pentru fiecare substanță de test.
41. Opacitatea corneană se calculează prin utilizarea pentru înregistrare a suprafeței corneei care este cea mai opacifiată. Valoarea medie a opacității corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului mediu maxim al opacității corneene obținut în oricare din momentele de observare, se furnizează apoi un punctaj general al categoriei pentru fiecare substanță de test (Tabelul 1).

Tabelul 1

Punctajele opacității corneene

Punctaj	Observații
0	Absența opacității
0,5	Opacitate redusă

Punctaj	Observații
1	Zone dispersate sau difuze; detaliile irisului sunt vizibile în mod clar
2	Zone translucide ușor sesizabile; detaliile irisului sunt ușor neclare
3	Opacitate corneană severă; nu sunt vizibile anumite detalii ale irisului; dimensiunea pupilei este foarte puțin sesizabilă
4	Opacitate corneană completă; iris invizibil

42. Valoarea medie a retenției de fluoresceină pentru toți ochii testați se calculează numai pentru momentul de observare după 30 de minute, care este utilizat pentru punctajul general al categoriei furnizat pentru fiecare substanță de test (Tabelul 2).

Tabelul 2

Punctajele de retenție a fluoresceinei

Punctaj	Observații
0	Absența retenției de fluoresceină
0,5	Colorare redusă a unor celule izolate
1	Colorare a unor celule izolate dispersate pe zona tratată a corneei
2	Colorare intensă focalizată sau confluentă a unor celule izolate
3	Zone confluențe întinse ale corneei care rețin fluoresceina

43. Efectele morfologice includ «corodarea» celulelor epiteliale corneene, «detașarea» epiteliului, «formarea de asperități» la nivelul suprafeței corneene și «aderarea» de cornee a substanței de test. Aceste rezultate pot varia în gravitate și pot exista simultan. Clasificarea rezultatelor este subiectivă în funcție de interpretarea formulată de cercetător.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

44. Rezultatele pentru opacitatea corneană, inflamarea corneei și reținerea fluoresceinei trebuie evaluate separat pentru a genera o clasă ICE pentru fiecare caracteristică. Clasele ICE pentru fiecare caracteristică sunt combinate ulterior pentru a genera o clasificare a potențialului iritant pentru fiecare substanță de test.

Criterii de decizie

45. După evaluarea fiecărei caracteristici, se pot desemna clasele ICE în funcție de un interval predeterminat. Interpretarea grosimii corneene (Tabelul 3), a opacității (Tabelul 4), și a retenției de fluoresceină (Tabelul 4) care utilizează patru clase ICE este realizată în conformitate cu următoarele scale:

Tabelul 3

Criteriile de clasificare a ICE pentru grosimea corneană

Inflamarea corneană medie (%) (*)	Clasa ICE
0 până la 5	I
> 5 până la 12	II
> 12 până la 18 (> 75 min după tratament)	II
> 12 până la 18 (≤ 75 min după tratament)	III
> 18 până la 26	III

Inflamarea corneană medie (%) (*)	Clasa ICE
> 26 până la 32 (> 75 min după tratament)	III
> 26 până la 32 (≤ 75 min după tratament)	IV
> 32	IV

(*) Punctajele pentru inflamarea corneană sunt aplicabile numai dacă grosimea se măsoară cu un microscop oftalmologic Haag-Streit BP900 cu dispozitivul de măsurare a adâncimii nr. I și cu lărgimea fantei setată la 9½, respectiv egală cu 0,095 mm. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că microscopoele oftalmologice pot produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită.

Tabelul 4

Criteriile de clasificare a ICE pentru opacitate

Punctajul maxim mediu pentru opacitate (*)	Clasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Vezi tabelul 1.

Tabelul 5

Criteriile de clasificare a ICE pentru retenția de fluoresceină

Punctajul mediu al retenției de fluoresceină la 30 de minute post-tratament (*)	Clasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Vezi tabelul 2.

46. Clasificarea generală a potențialului iritant *in vitro* pentru o substanță de test este stabilită prin interpretarea clasificării potențialului iritant care corespunde combinării categoriilor obținute pentru inflamarea corneană, opacitatea corneană și retenția de fluoresceină, precum și prin aplicarea schemei prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6

Clasificări generale ale potențialului iritant *in vitro*

Clasificare	Combinatii ale celor 3 caracteristici
Coroziv/Iritant sever	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacitatea corneană ≥ 3 la 30 min (pentru cel puțin 2 ochi) Opacitatea corneană = 4 în orice moment (pentru cel puțin 2 ochi) Detașarea severă a epitelului (pentru cel puțin 1 ochi)

(*) Combinații a căror probabilitate de apariție este mai mică.

47. Astfel cum s-a arătat la punctul 1, dacă substanța de test nu este identificată drept substanță cu caracter coroziv sau cu potențial iritant sever la nivel ocular, trebuie efectuate testări suplimentare în scopul clasificării și etichetării. Metoda de testare ICE are o precizie totală cuprinsă între 83 % (120/144) și 87 % (134/154), o rată de rezultate fals pozitive între 6 % (7/122) și 8 % (9/116) și o rată de rezultate fals negative de 41 % (13/32) până la 50 % (15/30) pentru identificarea substanțelor cu caracter coroziv sau cu potențial iritant sever la nivel ocular, prin comparație cu datele metodei de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate conform sistemelor de clasificare EPA (1), EU (2), sau GHS (3). Atunci când din baza de date sunt excluse substanțe din anumite clase chimice (și anume, alcoolii și agenți tensioactivi) și fizice (și anume, substanțe solide), precizia metodei ICE raportată la sistemele de clasificare UE, EPA și GHS este cuprinsă între 91 % (75/82) și 92 % (69/75), rata de rezultate fals pozitive este cuprinsă între 5 % (4/73) și 6 % (4/70), iar rata de rezultate fals negative este cuprinsă între 29 % (2/7) și 33 % (3/9) (4).
48. Chiar dacă pentru o substanță de test nu se obține încadrarea în clasa substanțelor având caracter coroziv sau potențial iritant sever, datele ICE pot fi utile în combinație cu datele de testare obținute prin testul *in vivo* pe ochi de iepure sau printr-o testare *in vitro* validată în mod corespunzător, pentru a evalua în continuare utilitatea și limitele de aplicare ale metodei de testare ICE în ceea ce privește identificarea substanțelor având un potențial iritant redus și a celor neiritante (sunt în curs de elaborare linii directoare privind utilizarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare).

Criterii de acceptare a studiului

49. Un test este considerat acceptabil dacă martorul negativ sau grupul martor solvent/eluent și martorii pozitivi testați în paralel conduc la o clasificare a caracterului iritant care încadrează în clasa substanțelor neiritante și, respectiv, în clasa substanțelor având potențial iritant sever/coroziv.

Raport de testare

50. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

Substanțe testate și de control

Denumire (denumiri) chimică (chimice), precum denumirea structurală utilizată de *Chemical Abstracts Service* (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;

Numărul de înregistrare (*Registry Number -RN*) CAS, dacă se cunoaște;

Puritatea și compoziția substanței sau a amestecului [în procent(e) de greutate], în măsura în care informația respectivă este disponibilă;

Proprietăți fizico-chimice, precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;

Tratamentul substanțelor testate/de control înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

Stabilitate, dacă este cunoscută.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

Numele și adresa sponsorului, a instalației de testare și a directorului de studiu;

Identificarea sursei ochilor (de exemplu, întreprinderea unde au fost colectați);

Condițiile de depozitare și transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp până la începerea testării);

Dacă sunt disponibile, caracteristicile specifice ale animalelor de la care au fost colectați ochii (de exemplu, vârsta, sexul, greutatea animalului donator).

Justificarea metodei de testare și a protocolului utilizat

Integritatea metodei de testare

Procedura utilizată pentru a asigura integritatea în timp (și anume, precizia și fiabilitatea) a metodei de testare (de exemplu, testarea periodică a substanțelor de verificare, utilizarea datelor istorice de control negative și pozitive).

Criteriile pentru un test acceptabil

După caz, intervale pentru martorii etalon acceptabili testați în paralel pe baza datelor istorice.

Condiții de testare

Descrierea sistemului de testare utilizat;

Microscopul oftalmologic utilizat (de exemplu, modelul);

Reglajele instrumentelor pentru microscopul oftalmologic utilizat;

Informații privind ochii de pui utilizați, inclusiv specificații privind calitatea acestora;

Detalii privind procedura de testare utilizată,

Concentrația (concentrațiile) substanței de test utilizate;

Descrierea tuturor modificărilor procedurii de testare;

Trimiteri la datele istorice ale modelului (de exemplu, martori negativi și pozitivi, substanțe de verificare, substanțe etalon);

Descrierea criteriilor de evaluare folosite;

Rezultate

Descrierea altor efecte observate;

După caz, fotografii ale ochiului;

*Discutarea rezultatelor**Concluzie*

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006. JO L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (3) United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Disponibil la:

[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. Document disponibil la adresa:

[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. Document disponibil la adresa:

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

- (6) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei. JO L 396, 30.12.2006, p. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Document disponibil la adresa:
- [http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Document disponibil la adresa:
- [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. Document disponibil la adresa:
- [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). Document disponibil la adresa:
- [<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. Document disponibil la adresa:
- [<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. Document disponibil la adresa:
- [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. Document disponibil la adresa:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță etalon: O substanță utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date de susținere privind efectele cunoscute; și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Corneea: Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

Opacitate corneeană: Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță de test. Opacitatea corneeană crescută este un indicator al unei leziuni a corneei.

Inflamare corneeană: O măsurare obiectivă în testul ICE a gradului de dilatare a corneei după expunerea la o substanță de test. Se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor nivelului de bază al grosimii corneene (pre-doza) și ale grosimii înregistrate la intervale regulate după expunere la materialul testat prin testul ICE. Gradul de inflamare corneeană este un indicator al unei leziuni a corneei.

Categoria EPA 1: Caracter coroziv (distrugerea ireversibilă a țesutului ocular) sau afectare a corneei sau iritație care persistă mai mult de 21 de zile (1).

Categoria UE R41: Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (2).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Retenție de fluoresceină: O măsurare subiectivă în cadrul testului ICE a gradului în care fluoresceina de sodiu este reținută de celulele epiteliale din corneea după expunerea la o substanță de test. Gradul de retenție a fluoresceinei este un indicator al unei leziuni la nivelul epitelului cornean.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de riscuri fizice, riscuri pentru sănătate și riscuri pentru mediu, și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, fraze de pericol, fraze de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (3).

Categoria HS 1: Producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe de test pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare (3).

Risc: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, sistem sau (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Martor negativ: O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului testat. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanță de test și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul testat.

Substanță neiritantă: Substanțe care nu sunt încadrate în categoriile EPA I, II, sau III, în categoriile UE R41 sau R36; sau în categoria GHS 1, 2A, sau 2B de iritanți oculari (1)(2)(3).

Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular: (a) Substanță care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivelul ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

Iritant ocular: (a) Substanță care produce o modificare reversibilă la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria EPA II sau III, categoria UE R36 sau categoria GHS 1, 2A, sau 2B de iritanți oculari (1)(2)(3).

Substanță cu potențial iritant sever: (a) O substanță care provoacă lezarea tisulară la nivelul ochiului după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este reversibilă după 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o slăbire fizică severă a vederii; (b) Substanțe care sunt încadrate în categoria GHS 1, categoria EPA I sau categoria UE R41 de iritanți oculari (1) (2) (3).

Controlul pozitiv: O probă replică conținând toate componentele sistemului testat și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

Microscop oftalmologic: Instrument utilizat pentru a examina direct ochiul, sub puterea de mărire a unui microscop binocular, prin crearea unei imagini stereoscopice, drepte. În cazul metodei de testare ICE, acest instrument este utilizat pentru a vizualiza structurile anterioare ale ochiului de pui și pentru a măsura în mod obiectiv grosimea corneană cu ajutorul unui dispozitiv atașat de măsurare a grosimii.

Martor solvent/eluent: O probă netratată care conține toate componentele sistemului testat, inclusiv solventul sau eluentul, care este analizată împreună cu probele tratate cu substanță de test și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța de test dizolvată în același solvent sau eluent. În plus, atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică dacă solventul sau eluentul interacționează cu sistemul testat.

Testare secvențială: O strategie de testare în trepte în cadrul căreia sunt revizuite toate informațiile existente privind o substanță de test, într-o anumită ordine, utilizând un proces de evaluare a forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscului, înainte de a trece la etapa următoare. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. Dacă potențialul iritant al unei substanțe de test nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se execută o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate face o clasificare lipsită de echivoc.

Metodă de testare validată: Metodă de testare în legătură cu care studiile de validare au fost încheiate în scopul determinării relevanței (inclusiv precizia) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

Forța probantă: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a ajunge la o concluzie în ceea ce privește riscul potențial al unei substanțe și a susține concluzia respectivă.

Apendicele 2

SUBSTANȚELE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE ICE

Înainte de utilizarea sistematică a unei metode de testare conforme cu prezenta metodă de testare, este posibil ca laboratoarele să dorească să își demonstreze performanțele tehnice prin identificarea corectă a clasificării caracterului coroziv pentru cele 10 substanțe recomandate în tabelul 1. Aceste substanțe au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru iritația/coroziunea locală la nivelul ochilor, care se bazează pe rezultatele testului *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) (și anume, categoriile 1, 2A, 2B, sau neclasificat și etichetat în conformitate cu GHS al Națiunilor Unite) (3) (7). Totuși, ținând cont de utilitatea validată a acestor analize (și anume, în scopul de a identifica numai substanțele care au caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), există numai două rezultate ale testelor destinate clasificării (coroziv/iritant sever sau necoroziv/fără potențial iritant sever) pentru a demonstra performanțele. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile comercial, să fie disponibile informații de referință *in vivo* de calitate superioară și să existe date de calitate furnizate de două metode *in vitro* pentru indicațiile orientative de testare care se elaborează. Din acest motiv, substanțele iritante au fost selectate din lista recomandată a ICCVAM care cuprinde 122 substanțe de referință pentru validarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare (a se vedea Apendicele H: Lista substanțelor de referință recomandate ICCVAM) (4). Informațiile de referință sunt disponibile în documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metodele de testare BCOP și ICE (18) (19).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda ICE

Substanță	CAS RN	Clasă chimică ⁽¹⁾	Formă fizică	Clasificare <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Clasificare <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Clorură de benzoilconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Clorhexidină	55-56-1	Amină, amidină	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Acid dibenzoil-L-tartric	2743-38-6	Acid carboxilic, ester	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Imidazol	288-32-4	Heterociclu	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Acid tricloracetic (30 %)	76-03-9	Acid carboxilic	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Clorură de 2,6-diclorbenzoil	4659-45-4	Halogenură de acil	Lichid	Categoria 2A	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Etil-2-metil-acetoacetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2B	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Azotat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2A	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Glicerol	56-81-5	Alcool	Lichid	Neetichetat	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
n-Hexan	110-54-3	Hidrocarbură (aciclică)	Lichid	Neetichetat	Necoroziv/Fără potențial iritant sever

Prescurtări: Nr. CASRN = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service.

⁽¹⁾ Clasele chimice sunt desemnate pentru fiecare substanță de test prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

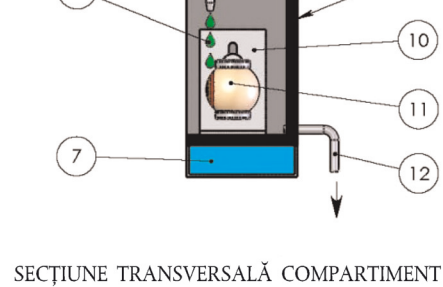
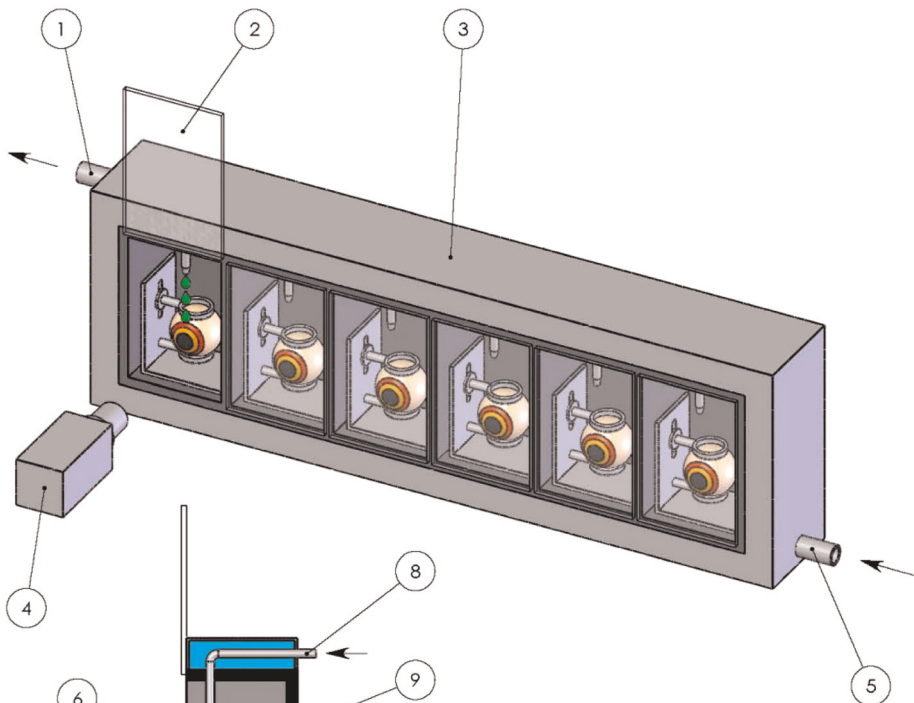
⁽²⁾ Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS a Națiunilor Unite (3) (7).

⁽³⁾ Pe baza rezultatelor obținute prin analizele BCOP și ICE.

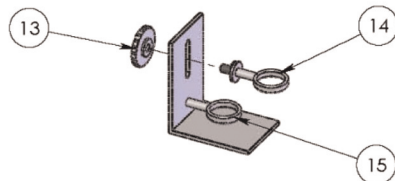
Apendicele 3

Scheme ale aparatului de suprafuziune ICE și ale clemelor pentru ochi

[A se vedea Burton et al. (17) pentru descrieri generice suplimentare ale aparatului de suprafuziune și ale clemelor pentru ochi]



SECȚIUNE TRANSVERSALĂ COMPARTIMENT



SUPORT OCHI

NR. CRT.	DESCRIERE
1	EVACUARE APĂ CALDĂ
2	UȘĂ GLISANTĂ
3	APARAT DE SUPRAFUZIUNE
4	INSTRUMENT DE MĂSURARE OPTICĂ
5	ADMISIE APĂ CALDĂ
6	SOLUȚIE SALINĂ
7	APĂ CALDĂ
8	ADMISIE SOLUȚIE SALINĂ
9	COMPARTIMENT
10	SUPORT OCHI
11	OCHI DE PUI
12	EVACUARE SOLUȚIE SALINĂ
13	ȘURUB FIXARE
14	BRAȚ SUPERIOR AJUSTABIL
15	BRAȚ INFERIOR FIX