

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 1152/2010**z 8. decembra 2010,****ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)****(Text s významom pre EHP)**

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ⁽¹⁾, a najmä na jeho článok 13 ods. 3,

keďže:

- (1) Nariadenie Komisie (ES) č. 440/2008 ⁽²⁾ obsahuje testovacie metódy na účely stanovenia fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látok, ktoré sa majú uplatňovať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006.
- (2) Je potrebné aktualizovať nariadenie (ES) č. 440/2008 tak, aby prioritne zahŕňalo dve nové testovacie metódy *in vitro* na očnú dráždivosť, ktoré prijala OECD s cieľom obmedziť počet zvierat používaných na pokusné účely, v súlade so smernicou Rady 86/609/EHS z 24. novembra

1986 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení členských štátov týkajúcich sa ochrany zvierat používaných na pokusné a iné vedecké účely ⁽³⁾. Tento návrh sa konzultoval so zúčastnenými stranami.

- (3) Nariadenie (ES) č. 440/2008 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť a doplniť.
- (4) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného článkom 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

V časti B prílohy k nariadeniu (ES) č. 440/2008 sa dopĺňajú kapitoly B.47 a B.48, ako sa uvádza v prílohe k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom nasledujúcim po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 8. decembra 2010

Za Komisiu

predseda

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 358, 18.12.1986, s. 1.

PRÍLOHA

„B. 47 TESTOVACIA METÓDA ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTKO

ÚVOD

1. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky je testovacia metóda *in vitro*, ktorá sa môže používať za určitých okolností a so špecifickými obmedzeniami na klasifikáciu látok a zmesí ako „očných žieravín a silne dráždivých látok“ (1) (2) (3). Na účely tejto testovacej metódy sa silne dráždivé látky vymedzujú ako dráždivé látky vyvolávajúce očné lézie, ktoré u králikov pretrvávajú najmenej 21 dní po podaní. Hoci sa nepovažuje za platnú a plnohodnotnú náhradu *in vivo* testu králičích očí, na účely regulačnej klasifikácie a označovania v rámci určitej sféry použiteľnosti sa odporúča používať testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky ako súčasť stratégie postupného testovania (4) (5). Testované látky a zmesi (6) možno klasifikovať ako očné žieraviny alebo silne dráždivé látky bez ďalšieho testovania na králikoch. Látka, ktorej testovanie je negatívne, by sa musela testovať na králikoch s využitím stratégie sekvenčného testovania, ako sa ustanovuje v usmernení OECD pre testy 405 (7) (kapitola B.5 tejto prílohy).
2. Účelom tejto metódy je opis postupov, ktoré sa používajú na posudzovanie možnej očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky meraním jej schopnosti vyvolať zákal a zvýšenú priepustnosť v izolovanej hovädzej rohovke. Toxické účinky na rohovku sa merajú: i) zníženým prestupom svetla (zákal) a ii) zvýšeným prechodom farbiva fluoresceínu sodného (priepustnosť). Hodnotenia zákalu a priepustnosti rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky sa zlučia a odvodí sa hodnotiace číslo *in vitro* (*In Vitro* Irritancy Score, ďalej len „IVIS“), ktoré sa používa na klasifikáciu úrovne dráždivosti testovanej látky.
3. Očné dráždivé látky vyvolávajúce lézie, ktoré ustúpia za menej ako 21 dní, a nedráždivé látky sa takisto testovali s využitím testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Presnosť a spoľahlivosť testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky pre látky v týchto kategóriách sa však formálne neposudzovala.
4. Vymedzenie pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Táto testovacia metóda vychádza z protokolu testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky medziantentúrneho koordinačného výboru pre overovanie alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ďalej len „ICCVAM“) (8), ktorý bol vytvorený podľa medzinárodnej hodnotiacej štúdie (4)(5)(9) s príspevkami od Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód a japonského centra pre overovanie alternatívnych metód. Tento protokol vychádza z informácií získaných od Inštitútu pre vedy *in vitro* a z protokolu INVITTOX 124 (10), ktorý predstavuje protokol používaný pri rozbere predbežnej hodnotiacej štúdie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, ktorú financovalo Európske spoločenstvo a ktorá prebehla v rokoch 1997–1998. Obidva protokoly vychádzajú z metodiky rozboru testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, ktorú prvýkrát zverejnil Gautheron a kolektív (11).
6. Zistené obmedzenia tejto testovacej metódy vychádzajú z vysokých mier falošnej pozitivity na alkoholy a ketóny a z vysokej miery falošnej negativity na tuhé látky zaznamenané v overovacej databáze (pozri odsek 44) (5). Keď sa látky týchto chemických a fyzikálnych tried vylúčia z databázy, presnosť testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky v klasifikačných systémoch EÚ, Agentúry na ochranu životného prostredia (ďalej len „EPA“) a Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok a zmesí (ďalej len „GHS“) sa výrazne zlepši (5). Vzhľadom na účely tohto rozboru (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) nie sú miery falošnej negativity rozhodujúce, pretože takéto látky by sa následne testovali na králikoch alebo inými vhodne overenými testami *in vitro* v závislosti od regulačných požiadaviek s použitím stratégie sekvenčného testovania, ktorá vychádza z prístupu podľa závažnosti dôkazov. Okrem toho aktuálna overovacia databáza neumožňuje primerané posúdenie niektorých chemických tried alebo tried výrobkov (napr. zmesí). Výskumníci by však mohli zvážiť použitie tejto testovacej metódy pre všetky druhy testovaných materiálov (vrátane zmesí), pričom pozitívny výsledok by sa mohol akceptovať ako údaj, ktorý naznačuje reakciu vo forme očnej žieravosti alebo silného podráždenia. Pozitívny výsledok získaný pre alkoholy alebo ketóny by sa však mal interpretovať opatrne pre riziko nadsadenej predpovede.
7. Všetky postupy s hovädzími očami a s hovädzími rohovkami by mali zodpovedať platným nariadeniam pre dané testovacie zariadenie a postupom na narábanie s materiálom živočíšneho pôvodu, medzi ktoré, okrem iných, patria tkanivá a tkanivové tekutiny. Odporúčajú sa všeobecne platné laboratórne bezpečnostné opatrenia (12).
8. Obmedzením tejto testovacej metódy je, že i keď sa pri nej zohľadňujú niektoré účinky na oči, ktoré sa posudzujú metódou testovania očnej dráždivosti králikov, a do istej miery aj ich závažnosť, neprihliada sa na poškodenia spojiviek a dúhovky. I keď sa vratnosť lézií rohovky nemôže pri rozbere zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky posudzovať samostatne, na základe štúdií očí králikov sa takisto podal návrh, aby sa hodnotenie počiatočnej hĺbky poškodenia rohovky mohlo používať na rozlišovanie nevratných a vratných účinkov (13). A napokon, testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky neumožňuje vykonať hodnotenie potenciálnej systémovej toxicity súvisiacej s expozíciou očí.

9. Práce na charakterizovaní použiteľnosti a obmedzení rozboru zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky pri zisťovaní slabo dráždivých a nedráždivých látok (pozri aj odsek 45) pokračujú. Používateľom sa takisto odporúča, aby poskytli vzorky a/alebo údaje hodnotiacim organizáciám na formálne posúdenie možných budúcich spôsobov použitia testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky aj na zisťovanie slabo dráždivých a nedráždivých látok.
10. V každom laboratóriu, ktoré prvýkrát zavádza tento rozbor, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 2. Laboratórium môže použiť tieto chemikálie na preukázanie svojej technickej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky prv, ako predloží údaje z rozboru zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na účely klasifikácie nebezpečenstva podľa predpisov.

PRINCÍP TESTU

11. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky je organotypický model, ktorý poskytuje krátkodobé zachovanie normálnej fyziologickej a biochemickej funkcie hovädzej rohovky *in vitro*. Pri tejto testovacej metóde sa poškodenie testovanou látkou hodnotí kvantitatívnymi meraniami zmien zákalu a priepustnosti rohovky opacitometrom, resp. spektrofotometrom vo viditeľnej oblasti svetla. Obidve merania sa používajú na výpočet hodnotiaceho čísla *in vitro*, ktoré sa používa na priradenie klasifikačnej kategórie nebezpečenstva podráždenia *in vitro* na predvídanie schopnosti testovanej látky vyvolať očné podráždenie *in vivo* (pozri časť Rozhodovacie kritériá).
12. V testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používajú izolované rohovky z očí čerstvo zabitých zvierat. Zákal rohovky sa kvantitatívne meria ako množstvo svetla prepusteného cez rohovku. Priepustnosť sa kvantitatívne stanovuje ako množstvo farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez celú hrúbku rohovky, a meria sa v médiu zadnej komory. Testované látky sa nanášajú na epitelálny povrch rohovky pridaním do prednej komory držiaka rohovky. Dodatok 3 obsahuje opis a schému držiaka rohovky, ktorý sa používa v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Držiaky rohovky sa dajú zakúpiť z rôznych zdrojov alebo sa dajú zhotoviť.

Zdroj a vek hovädzích očí a výber druhov zvierat

13. Dobytko odoslaný na bitúnky sa zvyčajne zabíja pre ľudskú spotrebu alebo pre iné komerčné spôsoby použitia. Ako zdroj rohoviek pre testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používajú iba zdravé zvieratá, ktoré sa považujú za vhodné na vstup do ľudského potravinového reťazca. Keďže rozsah hmotnosti dobytky je široký v závislosti od spôsobu chovu, veku a pohlavia, neexistuje žiadne odporúčanie pre hmotnosť zvieratá v čase zabitia.
14. Pri použití očí zo zvierat v rôznom veku môžu byť rozmery rohoviek rôzne. Rohovky s vodorovným priemerom > 30,5 mm a s hodnotami stredovej hrúbky rohovky $\geq 1\,100\ \mu\text{m}$ sa vo všeobecnosti získavajú z dobytky staršieho ako osem rokov, zatiaľ čo rohovky s vodorovným priemerom < 28,5 mm a s hodnotami stredovej hrúbky rohovky < 900 μm sa vo všeobecnosti získavajú z dobytky mladšieho ako päť rokov (14). Z toho dôvodu sa oči dobytky staršieho ako 60 mesiacov zvyčajne nepoužívajú. Oči dobytky mladšieho ako 12 mesiacov sa takisto tradične nepoužívajú, pretože tieto oči sa ešte vyvíjajú a hrúbka rohovky a priemer rohovky sú značne menšie, ako sa uvádza v prípade očí dospelého dobytky. Použitie rohoviek mladých zvierat (t. j. 6 až 12 mesačných) je však prípustné, pretože to má niekoľko výhod, ako je vyššia dostupnosť, užší vekový interval a menšie nebezpečenstvo súvisiace s potenciálnym vystavením pracovníkov bovinnej spongiformnej encefalopatii (15). Keďže ďalšie posúdenie vplyvu veľkosti alebo hrúbky rohovky na schopnosť reagovať na žieravé a dráždivé látky by bolo prínosné, odporúča sa, aby používatelia oznámili odhadovaný vek a/alebo hmotnosť zvierat, od ktorých rohovky použité v štúdiu pochádzajú.

Odber a doprava očí do laboratória

15. Odber očí vykonávajú zamestnanci bitúnkov. V snahe minimalizovať mechanické a iné druhy poškodenia očí by sa oči mali vylúpnúť čo najskôr po zabití. Zamestnanci bitúnkov by pri oplachovaní hlavy zvierat nemali použiť žiadny detergent, aby sa predišlo vystaveniu očí pôsobeniu potenciálne dráždivých látok.
16. Oči by sa mali úplne ponoriť do Hankovho vyváženého soľného roztoku (ďalej len „HBSS“) v nádrži vhodnej veľkosti a dopraviť do laboratória takým spôsobom, aby sa minimalizovalo poškodenie a/alebo kontaminácia baktériami. Keďže odber očí sa vykonáva počas zabíjania, tieto oči môžu byť vystavené styku s krvou alebo inými biologickými látkami vrátane baktérií a iných mikroorganizmov. Preto je dôležité minimalizovať nebezpečenstvo kontaminácie (napr. uložením nádrže s očami na ľad, pridaním antibiotík do HBSS, ktorý sa používa na skladovanie očí pri preprave [napr. dávkou penicilínu 100 IU/ml a streptomycínu 100 mg/ml]).
17. Časový interval medzi odberom očí a použitím rohoviek na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky by sa mal minimalizovať (zvyčajne sa odber a použitie vykoná v jednom dni) a mal by byť preukázateľný, aby sa nedali spochybniť výsledky rozboru. Základom pre tieto výsledky sú výberové kritériá na oči, ako aj reakcie pri pozitívnej a negatívnej kontrole. Všetky oči použité na rozbor by mali byť z jednej skupiny očí pochádzajúcich z odberu v určitý deň.

Výberové kritériá na oči používané na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

18. Keď sa oči dopravujú do laboratória, pozorne sa prekontrolujú s ohľadom na poškodenia vrátane zvýšeného zákalu, škrabancov a prekrvenia. Môžu sa použiť iba rohovky z očí bez takýchto chýb.
19. V ďalších krokoch rozboru sa takisto posudzuje kvalita každej rohovky. Rohovky, ktoré majú po prvej hodine ustaľovania zákal väčší ako sedem zákalových jednotiek, sa majú vyradiť (POZNÁMKA: opacitometer by sa mal kalibrovať podľa noriem zákalu, ktoré sa používajú na stanovenie zákalových jednotiek, pozri dodatok 3).
20. Skupina pre každú úpravu (testovaná látka, súbežné negatívne a pozitívne kontroly) sa skladá minimálne z troch očí. Tri rohovky by sa mali použiť na negatívnu kontrolu pri rozbere testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Keďže odobrané rohovky pochádzajú z celých očných guľí a tieto sa inštalujú do komôr na rohovky, existuje tu možnosť, že táto manipulácia môže ovplyvniť jednotlivé hodnoty zákalu a priepustnosti rohovky (vrátane negatívnej kontroly). Okrem toho hodnoty zákalu a priepustnosti rohoviek z negatívnej kontroly sa používajú na korigovanie testovaného predmetu a hodnoty zákalu a priepustnosti rohoviek z pozitívnej kontroly pri výpočtoch IVIS.

POSTUP**Príprava očí**

21. Rohovky bez chýb sa vyrežú s 2 až 3 mm prúžkom sklery, ktorá pomáha pri následnej manipulácii, pričom sa postupuje opatrne, aby nedošlo k poškodeniu epitelu a endotelu rohovky. Oddelené rohovky sa nainštalujú do špeciálne navrhnutých držiakov rohovky pozostávajúcich z prednej a zadnej priehradky, ktoré sa dotýkajú epitelálnej, resp. endotelálnej strany rohovky v uvedenom poradí. Obidve komory sa naplnia prebytkom predhriateho minimálneho základného média Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium, ďalej len „EMEM“) (najprv zadná komora), čím sa zabezpečí, že sa nevytvoria žiadne bubliny. Zariadenie sa potom ušľahuje pri teplote $32 \pm 1^\circ\text{C}$ aspoň jednu hodinu, čím sa umožní, aby sa rohovky dostali do rovnováhy s médiom a dosiahli bežnú metabolickú aktivitu v najväčšej možnej miere (približná teplota povrchu rohovky *in vivo* je 32°C).
22. Po dobe ustaľovania sa do obidvoch komôr pridá čerstvé predhriate EMEM a pre každú rohovku sa odčítajú základné údaje o zákale. Všetky rohovky, ktoré vykazujú makroskopické poškodenie tkaniva (napr. škrabance, pigmentáciu, neovaskularizáciu) alebo zákal > 7 zákalových jednotiek, sa vyradia. Vypočítajú sa priemerné hodnoty zákalu všetkých ustálených rohoviek. Minimálne tri rohovky s hodnotami zákalu blízкими strednej hodnote všetkých rohoviek sa vyberú ako rohovky na negatívnu kontrolu (alebo kontrolu rozpúšťadla). Zvyšné rohovky sa potom rozdelia do skupín na úpravu a pozitívnu kontrolu.
23. Keďže tepelná kapacita vody je vyššia ako tepelná kapacita vzduchu, voda poskytuje stabilnejšie teplotné podmienky inkubácie. Preto sa odporúča použiť vodný kúpeľ na udržiavanie držiaka rohovky a jeho obsahu na teplote $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Vzdušné inkubátory sa však takisto môžu používať, pričom sa predpokladajú opatrenia na udržiavanie stabilnej teploty (napr. predhriatím držiakov a médií).

Nanesenie testovanej látky

24. Používajú sa dva rôzne protokoly na úpravu, jeden na kvapaliny a povrchovo aktívne látky (tuhé látky alebo kvapaliny) a jeden na povrchovo neaktívne tuhé látky.
25. Kvapaliny sa testujú nezriedené, zatiaľ čo povrchovo aktívne látky sa testujú pri koncentrácii 10 % m/V v 0,9 % roztoku chloridu sodného, v destilovanej vode alebo v inom rozpúšťadle, o ktorom sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém. Polotuhé látky, pasty a vosky sa zvyčajne testujú ako kvapaliny. Pre alternatívne koncentrácie zriedenia by sa mali uviesť príslušné dôvody. Rohovky sa vystavia pôsobeniu kvapalín a povrchovo aktívnych látok počas 10 minút. Pri použití inej dĺžky expozície by sa malo uviesť primerané vedecké zdôvodnenie.
26. Povrchovo neaktívne tuhé látky sa zvyčajne testujú ako roztoky alebo suspenzie s koncentráciou 20 % v 0,9 % roztoku chloridu sodného, v destilovanej vode alebo v inom rozpúšťadle, o ktorom sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém. Za určitých okolností a pri riadnom vedeckom zdôvodnení sa tuhé látky môžu testovať aj čisté priamym nanesením na povrch rohovky s použitím metódy otvorenej komory (pozri odsek 29). Rohovky sa vystavia pôsobeniu tuhých látok na štyri hodiny, ale podobne ako pri kvapalinách a povrchovo aktívnych látkach môžu sa použiť iné dĺžky expozície s primeraným vedeckým zdôvodnením.
27. V závislosti od fyzikálnej povahy a chemických vlastností (napr. tuhé látky, kvapaliny, viskózne či neviskózne kvapaliny) testovanej látky sa môžu používať rôzne metódy úpravy. Najdôležitejšie je zabezpečiť, aby testovaná látka primerane pokrývala epitelálny povrch a aby sa pri oplachovaní primerane odstránila. Metóda uzavretej komory sa zvyčajne používa na neviskózne až mierne viskózne kvapalné testované látky, zatiaľ čo metóda otvorenej komory sa zvyčajne používa na poloviskózne a viskózne kvapalné testované látky a na čisté tuhé látky.

28. Pri metóde uzavretej komory sa do prednej komory cez dávkovacie otvory na hornej strane komory zavedie dostatočné množstvo testovanej látky (750 μ l) tak, aby sa ňou pokryla epiteliálna strana rohovky, a otvory komory sa následne uzavrujú zátkami na čas expozície. Dôležité je zabezpečiť, aby každá rohovka bola vystavená pôsobeniu testovanej látky počas primeraného obdobia.
29. Pri metóde otvorenej komory sa pred úpravou vyberie prstencový zámok okna a sklenené okno z prednej komory. Kontrolná alebo testovaná látka (750 μ l alebo dostatočné množstvo testovanej látky na úplné pokrytie rohovky) sa naniesie priamo na epiteliálny povrch rohovky pomocou mikropipety. Ak sa testovaná látka ťažko pipetuje, môže sa na uľahčenie dávkovania naplniť do piestovej pipety pod tlakom. Špička piestovej pipety sa vloží do dávkovacieho hrotu striekačky tak, aby sa materiál mohol zaviesť do vytlačacieho hrotu pod tlakom. Súčasne s posúvaním piestu pipety nahor sa tlačí na piest striekačky. Ak sa v špičke pipety objavia vzduchové bubliny, testovaný materiál sa odstráni (vytlačí) a postup sa opakuje, pokiaľ sa špička nenaplní bez vzduchových bublín. Ak je potrebné, môže sa použiť obyčajná striekačka (bez ihly), pretože umožňuje odmerať presný objem testovanej látky a jej ľahšie naniesenie na epiteliálny povrch rohovky. Po dávkovaní sa sklenené okno vráti na svoje miesto v prednej komore a tým sa systém znova uzavrie.

Poexpozičná inkubácia

30. Po uplynutí expozičného obdobia sa testovaná látka, látka na negatívnu kontrolu alebo na pozitívnu kontrolu odstráni z prednej komory a epitel sa prepláchne aspoň trikrát (alebo pokiaľ nie sú viditeľné žiadne znaky prítomnosti testovanej látky) s EMEM (obsahujúcim fenolovú červenú). Médium s obsahom fenolovej červene sa používa na oplachovanie, lebo zmena farby fenolovej červene sa môže monitorovať, čím sa zistí účinnosť oplachovania kyslých alebo zásaditých materiálov. Rohovky sa umývajú viac ako trikrát, pokiaľ je farba fenolovej červene zmenená (na žltú alebo fialovú) alebo je testovaná látka stále viditeľná. Keď médium neobsahuje testovanú látku, rohovky sa opláchnu poslednýkrát s EMEM (bez fenolovej červene). EMEM (bez fenolovej červene) sa používa na konečné opláchnutie, aby sa zabezpečilo odstránenie fenolovej červene z prednej komory pred meraním zákalu. Predná komora sa potom znova naplní čerstvým EMEM bez fenolovej červene.
31. V prípade kvapalín alebo povrchovo aktívnych látok sa rohovky po opláchnutí inkubujú ďalšie dve hodiny pri teplote 32 ± 1 °C. Dlhší poexpozičný čas môže byť za určitých podmienok užitočný a mohlo by sa o ňom v jednotlivých prípadoch uvažovať. Rohovky upravené tuhú látkou sa na konci štvorhodinového expozičného obdobia dôkladne opláchnu, ale nevyžaduje sa ďalšia inkubácia.
32. Na konci poexpozičného inkubačného obdobia, v prípade kvapalín a povrchovo aktívnych látok, a na konci štvorhodinového expozičného obdobia, v prípade povrchovo neaktívnych tuhých látok, sa zaznamená zákal a priepustnosť každej rohovky. Každá rohovka sa takisto vizuálne prehliadne a prípadné pozorovania sa zaznamenávajú (napr. zlupovanie tkaniva, zvyšky testovanej látky, vzorky s nerovnomerným zákalom). Tieto pozorovania by mohli byť dôležité, lebo sa môžu prejaviť v kolísaní údajov opacitometra.

Kontrolné látky

33. Súbežné negatívne kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča a pozitívne kontroly sú súčasťou každého pokusu.
34. Keď sa testuje kvapalná látka s koncentráciou 100 %, do testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa začleňuje súbežná negatívna kontrola (napr. 0,9 % roztok chloridu sodného alebo destilovaná voda), aby sa dali zistiť nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa poskytol základ na koncové body rozboru. Tým sa takisto zabezpečuje, aby v dôsledku podmienok rozboru nedošlo k neprimeranej reakcii vo forme podráždenia.
35. Keď sa testuje zriedená kvapalina, povrchovo aktívna látka alebo tuhá látka, do testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa začleňuje súbežná kontrolná skupina rozpúšťadla/nosiča, aby sa dali zistiť nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa poskytol základ na koncové body rozboru. Môže sa použiť iba také rozpúšťadlo/nosič, u ktorého sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém.
36. Do každého pokusu sa začleňuje nejaká známa očná dráždivá látka ako súbežná pozitívna kontrola a tým sa overuje vyvolanie primeranej reakcie. Keďže rozbor zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používa v tejto testovacej metóde na zisťovanie žieravých alebo silne dráždivých látok, v ideálnom prípade by sa na pozitívnu kontrolu mala použiť referenčná látka, ktorá v tejto testovacej metóde vyvoláva závažnú reakciu. V snahe zabezpečiť možnosť vyhodnotiť premenlivosť reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však závažnosť dráždivej reakcie nemala byť extrémne silná.
37. Príklady pozitívnych kontrol na kvapalnú testovanú látku sú dimetylformamid alebo 1 % hydroxid sodný. Príkladom pozitívnej kontroly na tuhé testované látky je 20 % (hmotnosť na objem) roztok imidazolu v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

38. Referenčné látky sú užitočné na posudzovanie potenciálu očnej dráždivosti neznámych chemikálií určitej chemickej triedy alebo triedy výrobkov alebo na posudzovanie potenciálu pomernej dráždivosti očnej dráždivkej látky v rámci určitého rozsahu dráždivých reakcií.

Namerané koncové body

39. Zákal určuje množstvo svetla prepusteného cez rohovku. Zákal rohovky sa kvantitatívne meria pomocou opacitometra a výsledkom sú hodnoty zákalu merané na spojitých stupniciach.
40. Priepustnosť určuje množstvo farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez všetky bunkové vrstvy rohovky (t. j. od epitelu na vonkajšom povrchu rohovky cez endotel na vnútornom povrchu rohovky). 1 ml roztoku fluoresceínu sodného (4 alebo 5 mg/ml, keď sa testujú kvapaliny a povrchovo aktívne látky, resp. povrchovo neaktívne tuhé látky) sa pridá do prednej komory držiaka rohovky, ktorá sa dotýka epitelálnej strany rohovky, zatiaľ čo zadná komora, ktorá sa dotýka endotelálnej strany rohovky, sa naplní čerstvým EMEM. Držiak sa potom inkubuje vo vodorovnej polohe počas 90 ± 5 minút pri teplote 32 ± 1 °C. Množstvo fluoresceínu sodného, ktorý prejde do zadnej komory, sa kvantitatívne odmeria pomocou ultrafialovej/viditeľnej spektrofotometrie. Spektrofotometrické merania stanovené pri 490 nm sa zaznamenávajú ako hodnoty optickej hustoty (OD_{490}) alebo absorbie, ktoré sa merajú na spojitých stupniciach. Hodnoty priepustnosti fluoresceínu sa stanovujú z hodnôt OD_{490} nameraných spektrofotometrom pri viditeľnom svetle s použitím štandardnej optickej dĺžky 1 cm.
41. Alternatívne sa môže použiť snímač 96-jamkových mikrotitračných platní za predpokladu, že i) je možné vytvoriť lineárny rozsah snímača platní na stanovenie hodnôt OD_{490} pre fluoresceín a ii) použijú sa správne objemy vzoriek fluoresceínu na 96-jamkovej platničke, aby výsledkom boli hodnoty OD_{490} , ktoré sa rovnajú štandardnej optickej dĺžke 1 cm (to by mohlo vyžadovať kompletne naplnenie jamky [obyčajne 360 μl]).

ÚDAJE A SPRÁVA

Vyhodnotenie údajov

42. Keď sa vykoná korekcia hodnôt zákalu a priemernej priepustnosti (OD_{490}) vzhľadom na zákal pozadia a hodnoty priepustnosti OD_{490} negatívnej kontroly, priemerné hodnoty zákalu a priepustnosti OD_{490} pre každú upravenú skupinu by sa mali dosadiť do empiricky odvodeného vzorca na výpočet hodnotiaceho čísla dráždivosti *in vitro* (ďalej len „IVIS“) pre každú upravenú skupinu takto:

$$IVIS = \text{priemerná hodnota zákalu} + (15 \times \text{priemerná hodnota priepustnosti } OD_{490})$$

Sina a kol. (16) oznámili, že tento vzorec bol odvodený pri vnútrolaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách. Údaje vypočítané na súbore 36 zlúčenín v rámci štúdie za účasti viacerých laboratórií sa podrobili analýze podľa viacerých náhodných premenných s cieľom určiť rovnicu, ktorá by najlepšie vyjadrovala vzťah medzi údajmi *in vivo* a *in vitro*. Túto analýzu vykonali vedci v dvoch nezávislých spoločnostiach a odvodili takmer totožné rovnice.

43. Hodnoty zákalu a priepustnosti by sa mali posudzovať aj samostatne, aby sa zistilo, či testovaná látka vyvolala žieravý účinok, alebo silné podráždenie iba prostredníctvom jednej z dvoch koncových hodnôt (pozri Rozhodovacie kritériá).

Rozhodovacie kritériá

44. Látka, ktorá vyvoláva $IVIS \geq 55,1$, sa vymedzuje ako žieravá alebo silne dráždivá. Ako sa uvádza v odseku 1, ak sa testovaná látka nepreukáže ako očná žieravina alebo silne dráždivá látka, malo by sa vykonať ďalšie testovanie na účely klasifikácie a označovania. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky má celkovú presnosť 79 % (113/143) až 81 % (119/147), mieru falošnej pozitivity 19 % (20/103) až 21 % (22/103) a mieru falošnej negativity 16 % (7/43) až 25 % (10/40) v porovnaní s údajmi metódy na testovanie očí králikov *in vivo* klasifikovanej podľa klasifikačného systému EPA (1), EU (2) alebo GHS (3). Keď sa látky v rámci určitých chemických tried (t. j. alkoholy, ketóny) alebo fyzikálnych tried (t. j. tuhé látky) vylúčia z databázy, presnosť testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky v klasifikačných systémoch EÚ, EPA a GHS je v rozsahu 87 % (72/83) až 92 % (78/85), miera falošnej pozitivity je v rozsahu 12 % (7/58) až 16 % (9/56) a miera falošnej negativity je v rozsahu 0 % (0/27) až 12 % (3/26).
45. Aj keď sa nezíska klasifikácia očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky, údaje testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky môžu byť užitočné v spojení s testovacími údajmi z testu očí králikov *in vivo* alebo z vhodne overeného testu *in vitro* na ďalšie posúdenie použiteľnosti a obmedzení testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na zisťovanie slabodráždivých alebo nedráždivých látok (usmernenie na používanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* je v štádiu vývoja).

Kritériá prijateľnosti štúdie

46. Test sa považuje za prijateľný, ak výsledkom pozitívnej kontroly je IVIS, ktoré patrí do rozsahu dvoch štandardných odchýlok aktuálneho historického priemeru, ktorý sa má aktualizovať najmenej každé tri mesiace alebo vždy, keď sa vykoná nejaký prijateľný test v laboratóriách, kde sa testy vykonávajú zriedkavo (t. j. menej ako jedenkrát za mesiac). Výsledkom reakcií negatívnej kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča by mali byť hodnoty zákalu a priepustnosti, ktoré sú menšie ako stanovené horné hranice hodnôt zákalu a priepustnosti pozadia pre hovädzie rohovky upravené príslušnou negatívnou kontrolou alebo kontrolou rozpúšťadla/nosiča.

Správa o testovaní

47. Správa o testovaní by mala obsahovať tieto informácie, ak sú dôležité na vykonanie štúdie:

Testované a kontrolné látky

Názov chemikálie (názvy chemikálií), ako je štrukturálny názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (ďalej len 'CAS'), po ktorom nasledujú iné názvy, ak sú známe;

registračné číslo CAS, ak je známe;

čistota a zloženie látky alebo zmesi (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii;

fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, chemická trieda, rozpustnosť vo vode dôležitá na vykonanie štúdie;

prípadná úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie);

stabilita, ak je známa.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

Meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie;

identifikácia zdroja očí (t. j. zariadenie, v ktorom sa vykonal ich odber);

podmienky skladovania a dopravy očí (napr. dátum a čas odberu očí, časový interval pred začiatkom testovania, dopravné médiá a teplotné podmienky, všetky použité antibiotiká);

osobitné charakteristiky zvierat, od ktorých sa vykonal odber očí (napr. vek, pohlavie, hmotnosť darcovského zvierťa), ak sú k dispozícii.

*Zdôvodnenie testovacej metódy a použitý protokol**Integrita testovacej metódy*

Postup, ktorý sa používa na zabezpečenie integrity (t. j. presnosti a spoľahlivosti) testovacej metódy v čase (napr. pravidelné testovanie látok na preukázanie spôsobilosti, používanie historických negatívnych a pozitívnych kontrolných údajov).

Kritériá na prijateľný test

Prijateľné rozsahy súbežnej pozitívnej a negatívnej kontroly na základe historických údajov;

prijateľné rozsahy prípadných súbežných referenčných kontrol na základe historických údajov.

Podmienky testovania

Opis použitého testovacieho systému;

použitý typ držiaka rohovky;

informácie o kalibrácii zariadení použitých na meranie zákalu a priepustnosti (napr. opacimetra a spektrofotometra);

informácie o použitých hovädzích rohovkách, vrátane prehlásenia o ich kvalite;

podrobnosti o použitom testovacom postupe;

koncentrácia (koncentrácie) použitej testovanej látky (látok);

opis všetkých úprav testovacieho postupu;

odkaz na historické údaje modelu (napr. negatívne a pozitívne kontroly, látky na preukázanie spôsobilosti, referenčné látky);

opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky

Tabuľka údajov o jednotlivých testovaných vzorkách (napr. hodnoty zákalu a OD₄₉₀ a vypočítané IVIS na testované látky a pozitívne, negatívne a referenčné kontroly [ak sú zahrnuté] uvedené vo forme tabuliek, vrátane údajov z prípadných replikovaných a opakovaných pokusov a priemerné hodnoty \pm štandardná odchýlka pre každý pokus);

opis iných pozorovaných účinkov.

Diskusia

Záver

LITERATÚRA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual (Príručka na kontrolu označení): 2. vydanie. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency (Agentúra USA pre ochranu životného prostredia).
- (2) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene a doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006. Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (3) OSN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (ďalej len „GHS“)]. Druhé prepracované vydanie, New York a Ženeva: United Nations Publications, 2007. Dostupné na:

[\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html\]](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)
- (4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Oznámenie o záveroch retrospektívnej štúdie ICCVAM o organotypických rozboroch *in vitro* ako kontrolných testoch na zisťovanie potenciálnych očných žieravín a silne dráždivých látok). Dostupné na:

[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](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 (Správa o hodnotení testovacích metód – testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých a žieravých látok). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program (ďalej len „NTP“) medziagentúrneho strediska pre overovanie alternatívnych toxikologických metód (ďalej len „NICEATM“). Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)
- (6) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405 (Usmernenie na testovanie 405). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion (Usmernenie OECD na testovanie chemikálií. Akútne podráždenie očí/žieravosť). Dostupné na:

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

- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol (Protokol testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky odporúčaný výborom ICCVAM). In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives (V: Správa ICCVAM o hodnotení testovacej metódy – testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých látok a žieravín). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program medziagentúrneho strediska na overovanie alternatívnych toxikologických metód. Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:
- [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 (Súčasný stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky). Publikácia NIH č.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupné na:
- [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. (Protokol 124: rozbor zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky – ŠPP Microbiological Associates Ltd.), Ispra, Taliansko: Európske centrum pre validáciu alternatívnych metód (ďalej len „ECVAM“).
- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. a Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy (Testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky: rozbor dráždivosti očí *in vitro*). *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442 – 449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. a the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (Poradný výbor pre postupy kontroly nákaz v zdravotnej starostlivosti) (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings (Usmernenie na izolačné opatrenia: predchádzanie prenosu pôvodcov nákaz v organizáciách zdravotnej starostlivosti). Dostupné na:
- [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) Maurer, J.K., Parker, R.D. a 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 (Rozsah poranení rohovky ako mechanický základ podráždenia očí: hlavné zistenia a odporúčania na vývoj alternatívnych rozborov). *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106 – 117.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. a Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse (Anatómia a morfológia rohoviek hovädzích očí z bitúnka). *Can. J. Zool.* 73:2159 – 2165.
- (15) Collee, J. a Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I (BSE: o desaťročie ďalej – časť 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., a Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates (Spolupráca pri posudzovaní siedmich alternatív k Draize testu dráždivosti očí s použitím farmaceutických medziproduktov). *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 (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky). Dostupné na:
- [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. (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda izolovaného kuracieho oka). Dostupné na:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: blízkosť zhody výsledkov testovacej metódy s prijatými referenčnými hodnotami. Je to miera výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov „významnosti“. Tento pojem sa často používa ako zameniteľný s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy.

Referenčná látka: látka, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) stály a spoľahlivý zdroj (zdroje); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa testujú; iii) známe fyzikálne/chemické vlastnosti; iv) podporné informácie o známych účinkoch a v) známu účinnosť v rozsahu žiadanej reakcie.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

Zákal rohovky: miera rozsahu zakalenia rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Zvýšený zákal rohovky je príznakom poškodenia rohovky. Zákal sa môže posudzovať subjektívne, ako je to pri Draize teste očí králikov, alebo objektívne pomocou prístroja napr. opacimetra.

Priepustnosť rohovky: kvantitatívne meranie poškodenia epitelu rohovky stanovením množstva farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez všetky bunkové vrstvy rohovky.

EPA kategória 1: žieravé (nevratné zničenie očného tkaniva) alebo postihnutie rohovky alebo podráždenie, ktoré pretrváva viac ako 21 dní (1).

EÚ kategória R41: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie videnia po nanosení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní od nanosenia (2).

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je jedným z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

GHS (globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok): systém navrhovania klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a stupňov fyzických, zdravotných a environmentálnych nebezpečenstiev a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, upozornenia na nebezpečenstvo, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov na sprostredkovanie informácií o ich nepriaznivých účinkoch s cieľom chrániť ľudí (vrátane zamestnancov, pracujúcich, dopravcov, spotrebiteľov a subjekty zodpovedné za riešenie núdzových situácií) a životné prostredie (3).

GHS kategória 1: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažného fyzického zhoršenia videnia po nanosení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po nanosení (3).

Nebezpečenstvo: vnútorná vlastnosť činidla alebo situácia, ktorá má schopnosť vyvolať nepriaznivé účinky pri vystavení organizmu, systému alebo obyvateľstva (skupiny obyvateľov) pôsobeniu tohto činidla.

Hodnotiace číslo dráždivosti in vitro (ďalej len „IVIS“): empiricky odvodený vzorec, ktorý sa používa pri rozbere zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, pričom sa priemerné hodnoty zákalu a priepustnosti za každú ošetrovanú skupinu zlúčia do jediného hodnotiaceho čísla in vitro na každú ošetrovanú skupinu. $IVIS = \text{priemerná hodnota zákalu} + (15 \times \text{priemerná hodnota priepustnosti})$.

Negatívna kontrola: neupravená replika, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Nedráždivá látka: látka, ktorá v EPA kategórii I, II ani III; v EÚ kategórii R41 ani R36 ani v GHS kategórii 1, 2A ani 2B nie je klasifikovaná ako očná dráždivá látka.

Očná žieravina: a) látka, ktorá spôsobuje nevratné poškodenie tkaniva oka; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná žieravina (1) (2) (3).

Očná dráždivá látka: a) látka, ktorá po nanosení na predný povrch oka vyvoláva nevratnú zmenu v oku; b) látka, ktorá je v EPA kategórii II alebo III, v EÚ kategórii R36 alebo v GHS kategórii 2A alebo 2B klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Očná silne dráždivá látka: a) látka, ktorá po nanosení na predný povrch oka vyvoláva poškodenie očného tkaniva, ktoré neustúpi do 21 dní po nanosení, alebo spôsobuje závažné fyzické zhoršenie videnia; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Opacitometer: prístroj na meranie „zákalu rohovky“ kvantitatívnym vyhodnotením prestupu svetla cez rohovku. Typický prístroj má dve priehradky, z ktorých každá má vlastný zdroj svetla a fotobunku. Jedna priehradka sa používa na upravenú rohovku, zatiaľ čo druhá sa používa na kalibrovanie a vynulovanie prístroja. Svetlo z halogénovej lampy sa vyšle cez kontrolnú priehradku (prázdna komora bez okien alebo kvapaliny) do fotobunky a porovná sa so svetlom vyslaným do fotobunky cez pokusnú priehradku, v ktorej je umiestnená komora obsahujúca rohovku. Rozdiel v prestupe svetla z fotobuniek sa porovná a na číslícovej zobrazovacej jednotke sa ukáže číselná hodnota zákalu.

Pozitívna kontrola: replika obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a upravená látkou, o ktorej sa vie, že vyvoláva pozitívnu reakciu. S cieľom zabezpečiť možnosť vyhodnotiť premenlivosť reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však závažnosť reakcie nemala byť extrémne silná.

Spôľahlivosť: miera rozsahu, v ktorom sa testovacia metóda môže opakovane vykonávať v čase v laboratóriu a medzi laboratóriami, pričom sa používa rovnaký protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti.

Kontrola rozpúšťadla/nosiča: neupravená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému, vrátane rozpúšťadla alebo nosiča, ktorá sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami, a zistí sa základná reakcia vzoriek upravených testovanou látkou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukazuje sa aj to, či rozpúšťadlo, alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Postupné testovanie: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej látke kontrolujú v určitom poradí, s použitím postupu posudzovania závažnosti dôkazov v každom stupni a zisťuje sa, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečenstva pred postupom do ďalšieho stupňa. Ak sa dráždivý potenciál testovanej látky môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej látky nie je možné stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Overená testovacia metóda: testovacia metóda, v prípade ktorej sa ukončili hodnotiace štúdie na určenie významnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na určitý účel. Je dôležité poznamenať, že overená testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť z hľadiska presnosti a spoľahlivosti, aby sa mohla považovať za prijateľnú na navrhnutý účel.

Posudzovanie závažnosti dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podporu záveru, pokiaľ ide o potenciál nebezpečnosti nejakej látky.

Dodatok 2

Látky na preukazovanie spôsobilosti pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

Pred rutinným používaním testovacej metódy, ktorá zodpovedá tejto testovacej metóde, laboratóriá môžu preukázať svoju technickú spôsobilosť správnym stanovením klasifikácie očnej žieravosti 10 látok odporúčaných v tabuľke 1. Výber týchto látok sa vykonal tak, aby zastupovali ten rozsah reakcií lokálneho podráždenia oka/žieravého účinku na oko, ktorý vychádza z výsledkom testov očí králikov *in vivo* (TG 405) (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo neklasifikované a označené podľa GHS OSN (3) (7)). Vzhľadom na overenú použiteľnosť týchto rozborov (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) tu však existujú len dva výsledky testov na účely klasifikácie (žieravina/silne dráždivá látka alebo nežieravina/slabo dráždivá látka) na preukázanie spôsobilosti. Ďalším kritériom na výber bola komerčná dostupnosť látok, dostupnosť vysoko kvalitných referenčných údajov *in vivo* a existencia vysoko kvalitných údajov z dvoch metód *in vitro*, pre ktoré sa pripravujú usmernenia na testovanie. Z toho dôvodu sa dráždivé látky vybrali zo zoznamu 122 referenčných látok, ktoré odporučil výbor ICCVAM na overovanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* (pozri dodatok H: Referenčné látky odporúčané ICCVAM) (5). Referenčné údaje sú dostupné v podkladových kontrolných dokumentoch ICCVAM pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky a testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka (17) (18).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

Látka	CASRN	Chemická trieda ⁽¹⁾	Fyzikálna forma	Klasifikácia <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasifikácia <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Benzalkónium chlorid (5 %)	8001-54-5	Óniová zlúčenina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Chlórhexidín	55-56-1	Amín, amidín	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina dibenzoyl-L-vinná	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická zlúčenina	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina trichlóroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
2,6-dichlórbenzoyl chlorid	4659-45-4	Acylohalogenid	Kvapalina	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Etyl-2-metylacetoctan	609-14-3	Ketón, ester	Kvapalina	Kategória 2B	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Dusičnan amónny	6484-52-2	Anorganická soľ	Tuhá látka	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka
n-hexán	110-54-3	Uhl'ovodík (acyklický)	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka

Skratky: CASRN = Registračné číslo Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Chemické triedy sa stanovili pre každú testovanú látku s použitím štandardnej klasifikačnej schémy na základe klasifikačného systému National Library of Medicine Medical Subject Headings (dostupné na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Na základe výsledkov testu očí králikov *in vivo* (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (3)(7).

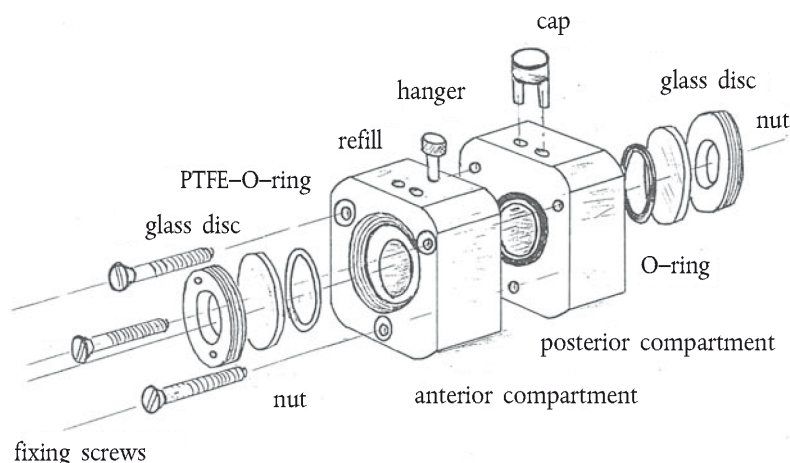
⁽³⁾ Na základe výsledkov testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky a izolovaného kuracieho oka.

Dodatok 3

DRŽIAK ROHOVKY NA TESTOVANIE ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY

1. Držiaky rohoviek na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sú vyrobené z inertného materiálu (napr. z polypropylénu). Držiaky sa skladajú z dvoch polovic (prednej a zadnej komory) a majú dve podobné valcovité vnútorné komory. Obidve komory majú objem 5 ml a sú ukončené skleneným oknom, cez ktoré sa zaznamenávajú namerané údaje zákalu. Obidve vnútorné komory majú priemer 1,7 cm a hĺbku 2,2 cm ⁽¹⁾. Tesniaci krúžok umiestnený na zadnej komore sa používa proti presakovaniu cez netesnosti. Rohovky sa umiestňujú endoteliálnou stranou nadol na tesniaci krúžok zadnej komory a predná komora sa položí na epiteliálnu stranu rohovky. Komory sú zafixované na mieste tromi nehrdzavejúcimi skrutkami na vonkajšej hrane komory. Na konci každej komory je sklenené okno, ktoré sa môže vybrať, aby sa zabezpečil ľahší prístup k rohovke. Tesniaci krúžok sa takisto nachádza medzi skleneným oknom a komorou a bráni presakovaniu cez netesnosti. Dva otvory na vrchnej strane každej komory umožňujú zavedenie a odstránenie média a testovaných zlúčenín. V čase úpravy a inkubácie sú uzavreté gumovými zátkami.

⁽¹⁾ Rozmery sú uvedené pre držiak rohovky, ktorý sa používa pre kravy vo veku 12 až 60 mesiacov. V prípade, že sa používajú 6 až 12-mesačné zvieratá, držiak sa musí navrhnuť tak, aby každá komora mala objem 4 ml a aby každá vnútorná komora mala priemer 1,5 cm a hĺbku 2,2 cm. Pri novom návrhu držiaka rohovky je veľmi dôležité, aby pomer vystavenej plochy povrchu rohovky k objemu zadnej komory bol taký istý ako tento pomer vo zvyčajne používanom držiaku rohovky. Je to potrebné preto, aby sa zabezpečilo správne určenie hodnôt priepustnosti na výpočet IVIS podľa navrhnutého vzorca.



Glosár

Glass disc: sklenený kotúč

PTFE-O-ring: teflónový tesniaci krúžok

Refill: plniaci otvor

Hanger: záves

Cap: zátka

Nut: matica

O-ring: tesniaci krúžok

Posterior compartment: zadná priehradka

Anterior compartment: predná priehradka

Fixing screws: fixačné skrutky

OPACITOMETER

- Opacitometer je zariadenie na meranie prestupu svetla. Svetlo z halogénovej lampy sa vyšle cez kontrolnú priehradku (prázdna komora bez okien alebo kvapaliny) do fotobunky a porovná sa so svetlom vyslaným do fotobunky cez pokusnú priehradku, v ktorej je umiestnená komora s rohovkou. Rozdiel v prestupe svetla z fotobuniek sa porovná a číselná hodnota zákalu sa vysvieti na zobrazovacej jednotke. Zákalové jednotky sú stanovené.
- Opacitometer by mal poskytovať lineárnu reakciu v určitom rozsahu údajov zákalu, ktoré patria do intervalov používaných pre rôzne klasifikácie opísané v prognostickom modeli (t. j. až po interval, ktorým sa určuje žieravosť/silná dráždivosť). V snahe zabezpečiť lineárne a presné údaje až do 75 – 80 zákalových jednotiek je potrebné vykonať kalibráciu opacitometra s použitím súboru kalibračných materiálov. Kalibračné materiály (matné polyesterové fólie) sa vložia do kalibračnej komory (komora na rohovku určená na uloženie kalibračných materiálov) a odčíta sa údaj na opacitometri. Kalibračná komora je navrhnutá tak, aby kalibračné materiály boli v nej uložené približne v rovnakej vzdialenosti medzi svetlom a fotobunkou ako rohovky pri meraní zákalu. Opacitometer sa najprv kalibruje na zákal 0 zákalových jednotiek s použitím kalibračnej komory bez kalibračného materiálu. Potom sa do kalibračnej komory vložia tri rôzne kalibračné materiály po sebe a odmerajú sa zákaly. Výsledkom merania kalibračných materiálov 1, 2 a 3 by mali byť údaje zákalu, ktoré sa rovnajú ich nastaveným hodnotám 75, 150, resp. 225 zákalových jednotiek $\pm 5\%$.

B 48 TESTOVACIA METÓDA IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK**ÚVOD**

1. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka je testovacia metóda *in vitro*, ktorá sa môže používať za určitých okolností a s určitými obmedzeniami na klasifikáciu látok a zmesí ako očných žieravín a silne dráždivých látok (1) (2) (3). Na účely tejto testovacej metódy sa silne dráždivé látky vymedzujú ako látky vyvolávajúce očné lézie, ktoré u králikov pretrvávajú najmenej 21 dní po podaní. I keď sa nepovažuje za platnú a plnohodnotnú náhrada testu králičích očí *in vivo*, odporúča sa používať testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka ako súčasť stratégie postupného testovania pre regulačnú klasifikáciu a na označovanie v rámci určitej sféry použiteľnosti (4) (5). Testované látky a zmesi (6), ktoré sú v tomto rozbere pozitívne, možno klasifikovať ako očné žieraviny alebo silne dráždivé látky bez ďalšieho testovania na králikoch. Látka, ktorej testovanie je negatívne, sa musí testovať na králikoch s využitím stratégie sekvenčného testovania, ako sa ustanovuje v usmernení OECD na testy 405 (7) (kapitola B.5 tejto prílohy).
2. Účelom tejto metódy je opísať postupy, ktoré sa používajú na posudzovanie potenciálnej očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky meraním jej schopnosti vyvolať toxicitu vo vylúpnutom kuracom oku. Toxicité účinky na rohovku sa merajú: i) kvalitatívnym hodnotením zákalu, ii) kvalitatívnym hodnotením poškodenia epitelu na základe nanesenia fluoresceínu do oka (zadržania fluoresceínu), iii) kvantitatívnym meraním zväčšenej hrúbky (zdurenia) a iv) kvalitatívnym posudzovaním makroskopického morfológického poškodenia povrchu. Zákal rohovky, zdurenie a hodnotenie poškodenia po vystavení pôsobeniu testovanej látky sa hodnotia jednotlivo a potom sa zlúčia a odvodí sa klasifikácia očného podráždenia.
3. Očné dráždivé látky vyvolávajúce lézie, ktoré ustúpia za menej ako 21 dní, a nedráždivé látky sa takisto testovali s využitím testovacej metódy izolovaného kuracieho oka. Presnosť a spoľahlivosť testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na látky v týchto kategóriách sa však formálne neposudzovala.
4. Vymedzenia sú uvedené v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Táto testovacia metóda vychádza z protokolu testovacej metódy izolovaného kuracieho oka medziagentúrneho koordinačného výboru pre overovanie alternatívnych metód (ďalej len „ICCVAM“) (8), ktorý bol vytvorený podľa medzinárodnej hodnotiacej štúdie (4) (5) (9) s príspevkami od Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód, japonského centra pre overovanie alternatívnych metód a z Odboru toxikológie a aplikovanej farmakológie Organizácie pre aplikovaný prírodovedecký výskum pre kvalitu života (ďalej len „TNO“) (Holandsko). Tento protokol vychádza z informácií získaných zo zverejnených protokolov, ako aj z aktuálneho protokolu, ktorý používa TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. Zistené obmedzenia tejto testovacej metódy vychádzajú z vysokej miery falošnej pozitivity na alkoholy a z vysokých mier falošnej negativity na tuhé látky a povrchovo aktívne látky (pozri odsek 47) (4). Keď sa látky týchto chemických a fyzikálnych tried vylúčia z údajovej základne, presnosť testovacej metódy izolovaného kuracieho oka v klasifikačných systémoch EÚ, EPA a GHS sa výrazne zlepší (4). Na základe účelu tohto rozboru (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) miery falošnej negativity nie sú rozhodujúce, pretože takéto látky sa následne testujú na králikoch alebo inými vhodne overenými testami *in vitro* v závislosti od regulačných požiadaviek s použitím stratégie sekvenčného testovania, ktorá vychádza z prístupu podľa závažnosti dôkazov. Okrem toho aktuálna overovacia databáza neumožňuje primerané posúdenie niektorých chemických tried alebo tried výrobkov (napr. zmesí). Výskumníci by však mohli zväziť použitie tejto testovacej metódy na testovanie všetkých druhov materiálov (vrátane zmesí), pričom pozitívny výsledok by sa mohol akceptovať ako údaj, ktorý naznačuje reakciu vo forme očnej žieravosti alebo silného podráždenia. Pozitívny výsledok získaný pre alkoholy by sa však mal interpretovať opatrne pre riziko nadsadenej predpovede.
7. Všetky postupy s kuracími očami a s hovädzimi rohovkami by mali vyhovovať platným nariadeniam daného testovacieho zariadenia a postupom na narábanie s materiálmi pochádzajúcimi z ľudí alebo zo zvierat, medzi ktoré okrem iných patria tkanivá a tkanivové tekutiny. Odporúčajú sa všeobecne platné laboratórne bezpečnostné opatrenia (15).
8. Obmedzením tejto testovacej metódy je, že i keď sa zohľadňujú niektoré účinky na oči, ktoré sa posudzujú metódou testovania očnej dráždivosti králikov, a do istej miery aj ich závažnosť, neprihliada sa na poškodenia spojiviek a dúhovky. I keď sa samotná vratnosť lézií rohovky nemôže posudzovať testovacou metódou izolovaného kuracieho oka, na základe štúdií očí králikov bol takisto podaný návrh, aby sa hodnotenie počiatkovej hĺbky poškodenia rohovky mohlo používať na rozlišovanie nevratných a vratných účinkov (16). A nakoniec, testovacia metóda izolovaného kuracieho oka neumožňuje vykonať hodnotenie potenciálu pre systémovú toxicitu súvisiacu s expozíciou očí.
9. Pokračujú práce na ďalšom charakterizovaní použiteľnosti a obmedzení testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na zisťovanie slabo dráždivých a nedráždivých látok (pozri aj odsek 48). Používateľom sa takisto odporúča, aby poskytli vzorky a/alebo údaje overovacím organizáciám na formálne posúdenie možných budúcich spôsobov použitia testovacej metódy izolovaného kuracieho oka, vrátane zisťovania očných slabo dráždivých a nedráždivých látok.

10. V každom laboratóriu, ktoré prvýkrát zavádza tento rozbor, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 2. Laboratórium môže použiť tieto chemikálie na preukázanie svojej technickej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy izolovaného kuracieho oka prv, ako predloží údaje z testovania izolovaného kuracieho oka na účely regulačnej klasifikácie nebezpečenstva.

PRINCÍP TESTU

11. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka je organotypický model, ktorý poskytuje krátkodobé zachovanie kuracieho oka *in vitro*. Pri tejto testovacej metóde sa poškodenie testovanou látkou hodnotí stanovením zdurenia rohovky, zákalu rohovky a zadržania fluoresceínu v rohovke. Zatiaľ čo posledné dva parametre vyžadujú kvalitatívne hodnotenie, analýza zdurenia rohovky poskytuje kvantitatívne hodnotenie. Každé meranie sa prevedie na kvantitatívny údaj, ktorý sa použije na výpočet celkového indexu podráždenia, alebo sa priradí kvalitatívna kategória, ktorá sa použije na priradenie klasifikácie očnej žieravosti a silnej dráždivosti *in vitro*. Každý z týchto výsledkov sa potom môže použiť na predvídanie potenciálu testovanej látky pôsobiť ako žieravina a silne dráždivá látka *in vivo* (pozri Rozhodovacie kritériá).

Zdroj a vek kuracích očí

12. Historicky sa na tento rozbor používali oči pochádzajúce z kurčiat z bitúnkov, kde sa zabíjajú na ľudskú spotrebu, čím sa odstránila potreba laboratórnych zvierat. Používajú sa iba oči zo zdravých zvierat, ktoré sa považujú za vhodné na vstup do ľudského potravinového reťazca.
13. I keď sa ešte nevykonala žiadna kontrolovaná štúdia na posúdenie optimálneho veku kurčiat, vek a hmotnosť kurčiat, ktoré sa používajú historicky na túto testovaciu metódu, zodpovedajú veku a hmotnosti jarných kurčiat spracovávaných tradične na hydinových bitúnoch (t. j. približne 7 týždňov, 1,5 – 2,5 kg).

Odber a doprava očí do laboratória

14. Hlavy by sa mali odberať hneď po znehybnení kurčiat zvyčajne elektrickým šokom alebo narezaním krku s následným vykrvácaním. Miestny zdroj kurčiat v blízkosti laboratória by mal byť situovaný tak, aby sa hlavy mohli dopraviť z bitúnka do laboratória dostatočne rýchlo, čím sa minimalizuje zhoršenie ich kvality a/alebo kontaminácia baktériami. Časový interval medzi odberom kuracích hláv a použitím očí v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka by mal byť čo najmenší (zvyčajne do dvoch hodín) a mal by byť preukázateľný, aby sa nedali spochybniť výsledky rozboru. Základom týchto výsledkov sú výberové kritériá na oči, ako aj reakcie na pozitívne a negatívne kontroly. Všetky oči použité na rozbor by mali byť z jednej skupiny očí pochádzajúcich z odberu v určitý deň.
15. Keďže oči sa odoberajú v laboratóriu, neporušené hlavy sa dopravujú z bitúnka pri teplote okolitého prostredia v plastových boxoch a zvlhčujú sa utierkami namočenými do izotonického fyziologického roztoku.

Výberové kritériá na oči používané na testovanie izolovaného kuracieho oka

16. Oči, ktoré majú po vylúpnutí vysoké počiatočné sfarbenie fluoresceínom (t. j. $> 0,5$) alebo vysokú hodnotu zakalenia rohovky (t. j. $> 0,5$), sa vyradia.
17. Každá skupina na úpravu a súbežnú pozitívnu kontrolu sa skladá najmenej z troch očí. Skupina na negatívnu kontrolu alebo na kontrolu rozpúšťadla (ak sa používa iné rozpúšťadlo ako fyziologický roztok) obsahuje minimálne jedno oko.

POSTUP

Príprava očí

18. Očné viečka sa opatrne odrežú, pričom sa dbá na to, aby sa nepoškodila rohovka. Celistvosť rohovky sa rýchlo vyhodnotí kvapkou 2 % (m/V) fluoresceínu sodného, ktorá sa naniesie na povrch rohovky na niekoľko sekúnd a potom sa opláchnie izotonickým fyziologickým roztokom. Oči ošetrené fluoresceínom sa potom prehliadnu pod biomikroskopom, aby sa potvrdilo, že rohovka je nepoškodená (t. j. hodnota zadržania fluoresceínu a zákalu rohovky $\leq 0,5$).
19. Ak je rohovka nepoškodená, oko sa vyreže z lebky a dbá sa na to, aby sa nepoškodila rohovka. Očná guľa sa vytiahne z očnej jamky, pričom sa tretie viečko pevne zachytí chirurgickými kliešťami a očné svaly sa prestrihnu ohnutými nožnicami s tupými hrotmi. Dôležité je zabrániť poškodeniu rohovky nadmerným tlakom (napr. kompresnými predmetmi).
20. Keď sa oko vyberie z očnej jamky, mala by sa na ňom ponechať viditeľná časť očného nervu. Po vybratí z očnej jamky sa oko položí na absorpčnú podložku a odreže sa tretie viečko a iné spojovacie tkanivá.

21. Vylúpnuté oko sa upevní do svorky z nehrdzavejúcej ocele tak, aby rohovka bola v kolmej polohe. Svorka sa potom preniesť do komory superfúzneho prístroja (16). Svorky by sa mali do superfúzneho prístroja vložiť tak, aby celá rohovka bola ponorená v izotonickom fyziologickom roztoku. Komory superfúzneho prístroja by mali mať riadenú teplotu $32 \pm 1,5$ °C. V dodatku 3 je uvedená schéma typického superfúzneho prístroja a očných svoriek, ktoré je možné kúpiť alebo zhotoviť. Prístroj sa môže upraviť tak, aby vyhovoval potrebám konkrétneho laboratória (napr. na uloženie rôzneho počtu očí).
22. Po vložení do superfúzneho prístroja sa oči znova prehliadnu pod biomikroskopom a skontroluje sa, či počas resekcie nedošlo k ich poškodeniu. Súčasne by sa mala odmerať aj hrúbka rohovky na vrchole rohovky s použitím meracieho zariadenia na biomikroskope. Oči s i) hodnotou zadržania fluoresceínu $> 0,5$; ii) hodnotou zákalu rohovky $> 0,5$ alebo iii) s akýmkoľvek inými znakmi poškodenia by sa mali nahradiť inými. Spomedzi očí, ktoré sa nevyradia na základe niektorého z týchto kritérií, sa musia vyradiť oči s hrúbkou rohovky, ktorá má odchýlku viac ako 10 % z priemernej hodnoty za všetky oči. Používatelia by mali vedieť, že biomikroskopy môžu poskytovať rôzne namerané údaje hrúbky rohovky, ak je nastavená rôzna šírka štrbiny. Šírka štrbiny by mala byť nastavená na 0,095 mm.
23. Keď sa všetky oči prezrú a sú vyhovujúce, inkubujú sa asi 45 až 60 minút, aby sa dostali do ustáleného stavu s testovacím systémom pred dávkovaním. Po dobe ustaľovania sa zaznamená nulové referenčné meranie na hrúbku a zákal rohovky, ktoré slúži ako základný stav (t. j. čas = 0). Hodnota fluoresceínu stanovená pri resekcii sa používa ako základné meranie tohto konečného výsledku.

Nanesenie testovanej látky

24. Hneď po nulových referenčných meraniach sa oko (v držiaku) vyberie zo superfúzneho prístroja, uloží sa do vodorovnej polohy a na rohovku sa nanesie testovaná látka.
25. Kvapalná testovaná látka sa zvyčajne testujú nezriedené, ale ak sa to považuje za potrebné, môžu sa zriediť (napr. ako súčasť návrhu štúdie). Ako rozpúšťadlo pre zriedené látky sa uprednostňuje fyziologický roztok. V riadených podmienkach sa však môžu používať aj iné rozpúšťadlá, ale mala by sa preukázať vhodnosť iných rozpúšťadiel použitých namiesto fyziologického roztoku.
26. Kvapalná testovaná látka sa nanesie na rohovku tak, aby celý povrch rohovky bol rovnomerne pokrytý testovanou látkou; štandardný objem je 0,03 ml.
27. Ak je to možné, tuhé látky by sa mali čo najjemnejšie rozdrviť tláčením v tretej miske alebo podobným drviacim nástrojom. Prášok sa potom nanesie na rohovku tak, aby povrch bol rovnomerne pokrytý testovanou látkou; štandardné množstvo je 0,03 g.
28. Testovaná látka (kvapalná alebo tuhá) sa nanesie na 10 sekúnd a potom sa opláchnie z oka izotonickým fyziologickým roztokom (približne 20 ml) pri teplote okolitého prostredia. Oko (v držiaku) sa následne vráti do superfúzneho prístroja do pôvodnej zvislej polohy.

Kontrolné látky

29. Súbežné negatívne kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča a pozitívne kontroly by sa mali začleniť do každého pokusu.
30. Keď sa testujú kvapaliny s koncentráciou 100 % alebo tuhé látky, v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa používa fyziologický roztok ako súbežná negatívna kontrola na zisťovanie nešpecifických zmien v testovacom systéme a aby sa zabezpečilo, že podmienky rozboru nevyvolajú nežiaducu reakciu vo forme podráždenia.
31. Keď sa testujú nezriedené kvapaliny, súbežná skupina na kontrolu rozpúšťadla/nosiča sa začlení do testovacej metódy, aby sa zistili nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa zabezpečilo, že podmienky rozboru nevyvolajú nežiaducu reakciu vo forme podráždenia. Ako sa uvádza v odseku 25, môže sa použiť iba také rozpúšťadlo/nosič, o ktorom sa preukázalo, že nemá nepriaznivé účinky na testovací systém.

32. Do každého pokusu sa začlení známa očná dráždivá látka ako súbežná pozitívna kontrola, aby sa overilo, že sa vyvolala náležitá reakcia. Keďže v tejto testovacej metóde sa používa rozbor izolovaného kuracieho oka na zisťovanie žieravín alebo silne dráždivých látok, na pozitívnu kontrolu by sa mala použiť referenčná látka, ktorá pri tejto testovacej metóde vyvoláva silnú reakciu. Aby sa však umožnilo vyhodnotenie premenlivosti reakcie pri pozitívnej kontrole v čase, závažnosť dráždivej reakcie by nemala byť extrémne silná. Mali by sa vygenerovať dostatočné údaje *in vitro* na pozitívnu kontrolu, aby bolo možné vypočítať štatisticky vymedzený prijateľný rozsah pre pozitívnu kontrolu. Ak na určitú pozitívnu kontrolu nie sú k dispozícii primerané historické údaje testovacej metódy izolovaného kuracieho oka, môže byť potrebné vykonať štúdie, ktoré by tieto informácie poskytl.
33. Príkladom pozitívnych kontrol na kvapalné testované látky je 10 % kyselina octová alebo 5 % benzalkónium chlorid, zatiaľ čo príkladom pozitívnych kontrol na tuhé testované látky je hydroxid sodný alebo imidazol.
34. Referenčné látky sú užitočné na posudzovanie schopnosti neznámych chemikálií určitých chemických tried alebo tried výrobkov spôsobovať očné podráždenie alebo na posudzovanie pomerného dráždivého potenciálu očnej dráždivej látky v určitom rozsahu dráždivých reakcií.

Meranie konečných výsledkov

35. Merané rohovky sa posudzujú pred úpravou a 30, 75, 120, 180 a 240 minút (± 5 minút) po opláchnutí po testovanej látke. Tieto časové body poskytujú primeraný počet meraní počas 4 hodín ošetrenia, pričom medzi meraniami zostáva dostatok času na vykonanie predpísaných pozorovaní pre všetky oči.
36. Posudzované konečné výsledky sú zákal rohovky, zdurení rohovky, zadržanie fluoresceínu v rohovke a morfológické účinky (napr. tvorba jamiek alebo uvoľnenie epitelu). Všetky konečné výsledky, s výnimkou zadržania fluoresceínu (ktoré sa stanovuje iba pred úpravou a 30 minút po vystavení pôsobeniu testovanej látky), sa stanovujú v každom z uvedených časových bodov.
37. Odporúča sa vyhotoviť fotografie na zdokumentovanie zákalu rohovky, zadržania fluoresceínu, morfológických účinkov a histopatológie, ak sa vykoná.
38. Po poslednom prehliadnutí po štyroch hodinách sa používateľom odporúča, aby oči uložili do vhodného fixačného roztoku (napr. neutrálneho tlmivého roztoku formalínu) pre prípadné histopatologické skúmanie.
39. Zdurení rohovky sa stanovuje meraním hrúbky rohovky optickým pachymetrom na biomikroskope. Vyjadruje sa v percentách a vypočíta sa z nameraných údajov hrúbky rohovky podľa tohto vzorca:

$$\left(\frac{\text{hrúbka rohovky v čase } t - \text{hrúbka rohovky v čase } = 0}{\text{hrúbka rohovky rohovky čase } = 0} \right) \times 100$$

40. Priemerná percentuálna hodnota zdurení rohovky za všetky testované oči sa vypočíta pre všetky časové body merania. Na základe najvyššej priemernej hodnoty zdurení rohovky, nameranej v každom časovom bode, sa potom určí celková hodnota kategórie na každú testovanú látku.
41. Zákal rohovky sa vypočíta tak, že na hodnotenie sa použije časť rohovky, ktorá je najhustejšie zakalená. Priemerná hodnota zákalu rohovky za všetky testované oči sa vypočíta pre všetky časové body merania. Na základe najvyššej priemernej hodnoty zákalu rohovky, nameranej v každom časovom bode, sa potom určí celková hodnota kategórie pre každú testovanú látku (tabuľka 1).

Tabuľka 1

Hodnoty zákalu rohovky

Hodnota	Vyhodnotenie pozorovania
0	Bez zákalu
0,5	Veľmi slabý zákal

Hodnota	Vyhodnotenie pozorovania
1	Roztrúsené alebo rozptýlené plochy; detaily dúhovky sú jasne viditeľné
2	Ľahko rozpoznateľná priehľadná plocha; detaily dúhovky sú mierne zatemnené
3	Silný zákal rohovky; žiadne špecifické detaily dúhovky nie sú viditeľné; veľkosť zrenice je sotva rozpoznateľná
4	Úplný zákal rohovky; dúhovka nie je viditeľná

42. Priemerná hodnota zadržania fluoresceínu za všetky testované oči sa vypočíta len na meranie v časovom bode 30 minút a použije sa na určenie celkovej hodnoty kategórie na každú testovanú látku (tabuľka 2).

Tabuľka 2

Hodnoty zadržania fluoresceínu

Hodnota	Vyhodnotenie pozorovania
0	Žiadne zadržanie fluoresceínu
0,5	Veľmi malá škvrna na jednej bunke
1	Škvry na jednej bunke rozptýlené po celej ošetrenej ploche rohovky
2	Ložiská alebo splývajúce škvry na jednej bunke
3	Splývajúce veľké plochy rohovky zadržiavajúce fluoresceín

43. Medzi morfológické účinky patrí 'jamkovanie' buniek epitelu rohovky, 'uvoľnenie' epitelu, 'zdrsnenie' povrchu rohovky a 'prilnutie' testovanej látky k rohovke. Tieto zistenia môžu byť rôzne, pokiaľ ide o ich závažnosť, a môžu sa vyskytovať súčasne. Klasifikácia týchto zistení je subjektívna podľa výkladu výskumníka.

ÚDAJE A SPRÁVA

Vyhodnotenie údajov

44. Výsledné hodnoty zákalu rohovky, zdurenia rohovky a zadržania fluoresceínu by sa mali posudzovať osobitne, aby sa stanovila trieda izolovaného kuracieho oka pre každý konečný výsledok. Triedy izolovaného kuracieho oka pre každý konečný výsledok sa potom zlúčia a stanoví sa klasifikácia dráždivosti na každú testovanú látku.

Rozhodovacie kritériá

45. Keď sa posúdi každý konečný výsledok, môžu sa priradiť triedy izolovaného kuracieho oka na základe vopred určeného rozsahu. Výklad hrúbky rohovky (tabuľka 3), zákalu (tabuľka 4) a zadržania fluoresceínu (tabuľka 5) s použitím štyroch tried izolovaného kuracieho oka sa robí podľa týchto stupní:

Tabuľka 3

Klasifikačné kritériá izolovaného kuracieho oka na hrúbku rohovky

Priemerné zdurenie rohovky (%) (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
0 až 5	I
> 5 až 12	II
> 12 až 18 (> 75 minút po ošetroaní)	II
> 12 až 18 (≤ 75 minút po ošetroaní)	III
> 18 až 26	III

Priemerné zdurenie rohovky (%) (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
> 26 až 32 (> 75 minút po ošetroaní)	III
> 26 až 32 (≤ 75 minút po ošetroaní)	IV
> 32	IV

(*) Tieto hodnoty zdurenia rohovky platia iba vtedy, ak sa hrúbka meria biomikroskopom Haag-Streit BP900 so zariadením na meranie hĺbky č. I a pri nastavení šírky štrbiny $9\frac{1}{2}$, ktorá sa rovná 0,095 mm. Používatelia by mali vedieť, že biomikroskopy môžu dávať rôzne namerané hodnoty hrúbky rohovky, ak je nastavená rôzna šírka štrbiny.

Tabuľka 4

Klasifikačné kritériá izolovaného kuracieho oka na zákal

Priemerná hodnota pre maximálny zákal (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 4,0	IV

(*) Pozri tabuľku 1.

Tabuľka 5

Klasifikačné kritériá izolovaného kuracieho oka na priemerné zadržanie fluoresceínu

Priemerná hodnota zadržania fluoresceínu 30 minút po ošetroaní (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 3,0	IV

(*) Pozri tabuľku 2.

46. Celková klasifikácia dráždivosti *in vitro* na testovanú látku sa hodnotí pomocou klasifikácie dráždivosti, ktorá zodpovedá kombinácii kategórií získaných pre zdurenie rohovky, zákal rohovky a zadržanie fluoresceínu a použitím schémy uvedenej v tabuľke 6.

Tabuľka 6

Celková klasifikácia dráždivosti *in vitro*

Klasifikácia	Kombinácie 3 konečných výsledkov
Žieravina/silne dráždivá látka	$3 \times IV$ $2 \times IV, 1 \times III$ $2 \times IV, 1 \times II$ (*) $2 \times IV, 1 \times I$ (*) Zákal rohovky ≥ 3 po 30 minútach (aspoň v 2 očiach) Zákal rohovky = 4 v ktoromkoľvek časovom bode (aspoň v 2 očiach) Závažné uvoľnenie epitelu (aspoň v 1 oku)

(*) Kombinácie, ktorých výskyt je menej pravdepodobný.

47. Ako sa uvádza v odseku 1, ak sa testovaná látka nepreukáže ako očná žieravina alebo silne dráždivá látka, malo by sa vykonať ďalšie testovanie na účely klasifikácie a označovania. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka má celkovú presnosť 83 % (120/144) až 87 % (134/154), mieru falošnej pozitivity 6 % (7/122) až 8 % (9/116) a mieru falošnej negativity 41 % (13/32) až 50 % (15/30) na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok v porovnaní s údajmi metódy na testovanie očí králikov *in vivo* klasifikovanej podľa klasifikačného systému EPA (1), EÚ (2) alebo GHS (3). Keď sa látky v rámci určitých chemických tried (t. j. alkoholy a povrchovo aktívne látky) a fyzikálnych tried (t. j. tuhé látky) vylúčia z databázy, presnosť testovania izolovaného kuracieho oka v klasifikačných systémoch EÚ, EPA a GHS je v rozsahu 91 % (75/82) až 92 % (69/75), miery falošnej pozitivity sú v rozsahu 5 % (4/73) až 6 % (4/70) a miery falošnej negativity sú v rozsahu 29 % (2/7) až 33 % (3/9) (4).
48. Aj keď sa nezíska klasifikácia očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky, údaje testovania izolovaného kuracieho oka môžu byť užitočné v spojení s testovacími údajmi z testu očí králikov *in vivo* alebo z vhodne overeného testu *in vitro* na ďalšie posúdenie použiteľnosti a obmedzení testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na zisťovanie slabo dráždivých a nedráždivých látok (usmernenie na používanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* je v štádiu vývoja).

Kritériá prijateľnosti štúdie

49. Test sa považuje za prijateľný, ak výsledkom súbežných negatívnych kontrol a kontrol rozpúšťadla/nosiča a súbežných pozitívnych kontrol je klasifikácia dráždivosti, ktorá patrí do triedy nedráždivých látok, resp. silne dráždivých látok/žieravín.

Správa o testovaní

50. Správa o testovaní by mala obsahovať tieto informácie, ak sú dôležité na vykonanie štúdie:

Testované a kontrolné látky

Názov chemikálie (názvy chemikálií), ako je štrukturálny názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (ďalej len 'CAS'), po ktorom nasledujú iné názvy, ak sú známe;

registračné číslo CAS, ak je známe;

čistota a zloženie látky alebo zmesi (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii;

fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, chemická trieda, rozpustnosť vo vode dôležitá na vykonanie štúdie;

prípadná úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie);

stabilita, ak je známa.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

Meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie;

identifikácia zdroja očí (t. j. zariadenie, v ktorom sa vykonal ich odber);

podmienky skladovania a dopravy očí (napr. dátum a čas odberu očí, časový interval pred začiatkom testovania);

osobitné charakteristiky zvierat, od ktorých sa vykonal odber očí (napr. vek, pohlavie, hmotnosť darcovského zvieratá), ak sú k dispozícii.

Zdôvodnenie testovacej metódy a použitý protokol

Integrita testovacej metódy

Postup, ktorý sa používa na zabezpečenie integrity (t. j. presnosti a spoľahlivosti) testovacej metódy v čase (napr. pravidelné testovanie látok na preukázanie spôsobilosti, používanie historických negatívnych a pozitívnych kontrolných údajov).

Kritériá pre prijateľný test

Prijateľné rozsahy prípadných súbežných referenčných kontrol na základe historických údajov.

Podmienky testovania

Opis použitého testovacieho systému;

použitý typ biomikroskopu (napr. označenie modelu);

nastavenia použitého biomikroskopu;

informácie o použitých kuracích očiach, vrátane prehlásenia o ich kvalite;

podrobnosti o použitom testovacom postupe;

koncentrácia (koncentrácie) použitej testovanej látky (látok);

opis všetkých úprav testovacieho postupu;

odkaz na historické údaje modelu (napr. negatívne a pozitívne kontroly, látky na preukázanie spôsobilosti, referenčné látky);

opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky

Opis iných pozorovaných účinkov;

prípadne fotografie oka.

*Diskusia**Záver**LITERATÚRA*

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual (Príručka na kontrolu označení): 2. vydanie. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency (Agentúra USA pre ochranu životného prostredia).
- (2) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene a doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006. Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (3) Organizácia Spojených národov (OSN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (ďalej len „GHS“)]. Druhé prepracované vydanie, OSN New York a Ženeva, 2007. Dostupné na:

[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 (Správa o hodnotení testovacích metód –testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých a žieravých látok). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program (ďalej len „NTP“) medziagentúrneho strediska pre overovanie alternatívnych toxikologických metód (ďalej len „NICEATM“). Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[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 (Oznámenie o závere retrospektívnej štúdie ICCVAM o organotypických rozboroch *in vitro* ako kontrolných testoch na zisťovanie potenciálnych očných žieravín a silne dráždivých látok). Dostupné na:

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

- (6) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405 (Usmernenie na testovanie 405). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion (Usmernenie OECD na testovanie chemikálií. Akútne podráždenie očí/žieravosť). Dostupné na:
[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 (Protokol testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovádzkej rohovky odporúčaný výborom ICCVAM). In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives (V: Správa ICCVAM o hodnotení testovacej metódy – testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých látok a žieravín). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program medziagentúrneho strediska na overovanie alternatívnych toxikologických metód. Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:
[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 (Súčasný stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda izolovaného kuracieho oka). Publikácia NIH č.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupné na:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
- (10) Prinsen, M.K. a 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 (Dôvody na testovanie vylúpnutých očí na očiach jatočných zvierat ako alternatívy k Draize testu dráždivosti na králikoch). *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) INVITTOX (1994). Chicken enucleated eye test (CEET). (Protokol 80: Testovanie vylúpnutých kuracích očí). Dostupné na:
[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. a Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test (Medzinárodná hodnotiacia štúdia ES/humanitárnych organizácií o alternatívach k Draize testu očnej dráždivosti). *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 [Testovanie vylúpnutých kuracích očí: praktická (predbežná) kontrola na hodnotenie schopnosti testovaných materiálov vyvolať očné podráždenie/žieravý účinok]. *Food Chem. Toxicol.* 34:291 – 296.
- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. a Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation (Organotypické modely na hodnotenie/predvídanie očného podráždenia). *Food Chem. Toxicol.* 35:23 – 37.
- (15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., a the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (Poradný výbor pre postupy na kontrolu nákaz v zdravotnej starostlivosti) (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings (Usmernenie pre izolačné opatrenia: predchádzanie prenosu pôvodcov nákaz v organizáciách zdravotnej starostlivosti). Dostupné na:
[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- (16) Maurer, J.K., Parker, R.D. a 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 (Rozsah poranení rohovky ako mechanický základ podráždenia očí: hlavné zistenia a odporúčania na vývoj alternatívnych rozborov). *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106 – 117.
- (17) Burton, A.B.G., M. York a R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants (Hodnotenie silne dráždivých látok *in vitro*). *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 (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovádzkej rohovky). Dostupné na:
[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 (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda izolovaného kuracieho oka). Dostupné na:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: blízkosť zhody výsledkov testovacej metódy s prijatými referenčnými hodnotami. Je to miera výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov „významnosti“. Tento pojem sa často používa ako zameniteľný s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy.

Referenčná látka: látka, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) stály a spoľahlivý zdroj (zdroje); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa testujú; iii) známe fyzikálne/chemické vlastnosti; iv) podporné informácie o známych účinkoch a v) známu účinnosť v rozsahu žiadanej reakcie.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

Zákal rohovky: miera rozsahu zakalenia rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Zvýšený zákal rohovky je príznakom poškodenia rohovky.

Zdurenie rohovky: pri testovaní izolovaného kuracieho oka objektívne meranie rozsahu rozťahnutia rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Vyjadruje sa v percentách a vypočíta sa zo základných (pred dávkovaním) meraní hrúbky rohovky a hrúbky zaznamenatej po vystavení pôsobeniu testovaného materiálu pri testovaní izolovaného kuracieho oka. Miera zdurenia rohovky je príznakom poškodenia rohovky.

EPA kategória 1: žieravé (nevratné zničenie očného tkaniva) alebo postihnutie rohovky alebo podráždenie, ktoré pretrváva viac ako 21 dní (1).

EÚ kategória R41: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie videnia po nanesení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní od nanesenia (2).

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je jedným z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Zadržanie fluoresceínu: pri testovaní izolovaného kuracieho oka subjektívne meranie množstva fluoresceínu sodného, ktorý zadržia epitelálne bunky v rohovke po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Miera zadržania fluoresceínu je príznakom poškodenia epitelu rohovky.

GHS (globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok): systém navrhovania klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a stupňov fyzických, zdravotných a environmentálnych nebezpečenstiev a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, upozornenia na nebezpečenstvo, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov na sprostredkovanie informácií o ich nepriaznivých účinkoch s cieľom chrániť ľudí (vrátane zamestnancov, pracujúcich, dopravcov, spotrebiteľov a subjekty zodpovedné za riešenie núdzových situácií) a životné prostredie (3).

GHS kategória 1: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie videnia po nanesení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po nanesení (3).

Nebezpečenstvo: vnútorná vlastnosť činidla alebo situácia, ktorá má schopnosť vyvolať nepriaznivé účinky pri vystavení organizmu, systému alebo obyvateľstva (skupiny obyvateľov) pôsobeniu tohto činidla.

Negatívna kontrola: neupravená replika, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Nedráždivá látka: látka, ktorá v EPA kategórii I, II ani III; v EÚ kategórii R41 ani R36, ani v GHS kategórii 1, 2A ani 2B nie je klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Očná žieravina: a) látka, ktorá spôsobuje nevratné poškodenie tkaniva oka; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná žieravina (1) (2) (3).

Očná dráždivá látka: a) látka, ktorá vyvoláva nevratnú zmenu v oku po nanosení na predný povrch oka; b) látka, ktorá je v EPA kategórii II alebo III, v EÚ kategórii R36 alebo v GHS kategórii 2A alebo 2B klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Očná silne dráždivá látka: a) látka, ktorá po nanosení na predný povrch oka vyvoláva poškodenie očného tkaniva, ktoré neustúpi do 21 dní po nanosení, alebo spôsobuje závažné fyzické zhoršenie videnia; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Positívna kontrola: replika obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a upravená látkou, o ktorej sa vie, že vyvoláva pozitívnu reakciu. S cieľom zabezpečiť možnosť vyhodnotiť premenlivosť reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však závažnosť reakcie nemala byť extrémne silná.

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v ktorom sa testovacia metóda môže opakovane vykonávať v čase v laboratóriu a medzi laboratóriami, pričom sa používa rovnaký protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti.

Biomikroskop: prístroj používaný na priame preskúmanie oka pri zväčšení binokulárnym mikroskopom s vytvorením stereoskopického vzpriameného obrazu. V testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa tento prístroj používa na prehliadanie predných štruktúr kuracieho oka, ako aj na objektívne meranie hrúbky rohovky pomocou pripojeného zariadenia na meranie hĺbky.

Kontrola rozpúšťadla/nosiča: neupravená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému, vrátane rozpúšťadla alebo nosiča, ktorá sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami, a zistí sa základná reakcia vzoriek upravených testovanou látkou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukazuje sa aj to, či rozpúšťadlo, alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Postupné testovanie: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej látke kontrolujú v určitom poradí, s použitím postupu posudzovania závažnosti dôkazov v každom stupni a zisťuje sa, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečenstva pred postupom do ďalšieho stupňa. Ak sa dráždivý potenciál testovanej látky môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej látky nemožno stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Overená testovacia metóda: testovacia metóda, pre ktorú sa ukončili hodnotiace štúdie a zistila sa významnosť (vrátane presnosti) a spoľahlivosť na určitý účel. Je dôležité poznamenať, že overená testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť z hľadiska presnosti a spoľahlivosti, aby sa mohla považovať za prijateľnú na navrhnutý účel.

Posudzovanie závažnosti dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podporu záveru, ktorý sa týka potenciálu nebezpečnosti nejakej látky.

Dodatok 2

LÁTKY NA PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI PRE TESTOVACIU METÓDU IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA

Pred rutinným používaním testovacej metódy, ktorá zodpovedá tejto testovacej metóde, môžu laboratória preukázať svoju technickú spôsobilosť správnym stanovením klasifikácie očnej žieravosti 10 látok odporúčaných v tabuľke 1. Výber týchto látok sa vykonal tak, aby zastupovali ten rozsah reakcií lokálneho podráždenia oka/žieravého účinku na oko, ktorý vychádza z výsledkom testov očí králikov *in vivo* (TG 405) (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo látky neklasifikované alebo označené podľa GHS OSN) (3) (7). Vzhľadom na overenú použiteľnosť týchto rozborov (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) tu však existujú len dva výsledky testov na účely klasifikácie (žieravina/silne dráždivá látka alebo nežieravina/slabo dráždivá látka) na preukázanie spôsobilosti. Dalším kritériom na výber bola komerčná dostupnosť látok, dostupnosť vysoko kvalitných referenčných údajov *in vivo* a existencia vysoko kvalitných údajov z dvoch metód *in vitro*, pre ktoré sa pripravujú usmernenia na testovanie. Z toho dôvodu sa dráždivé látky vybrali zo zoznamu 122 referenčných látok, ktoré odporučil výbor ICCVAM na overovanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* (pozri dodatok H: Zoznam referenčných látok odporúčaných ICCVAM) (4). Referenčné údaje sú dostupné v podkladových kontrolných dokumentoch ICCVAM pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovádzkej rohovky a testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka (18) (19).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti na testovanie izolovaného kuracieho oka

Chemikália	CASRN	Chemická trieda ⁽¹⁾	Fyzikálna forma	Klasifikácia ⁽²⁾ <i>in vivo</i>	Klasifikácia ⁽³⁾ <i>in vitro</i>
Benzalkónium chlorid (5 %)	8001-54-5	Óniová zlúčenina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Chlórhexidín	55-56-1	Amín, amidín	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina dibenzoyl-L-vinná	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická zlúčenina	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina trichlóroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
2,6-dichlórbenzoyl chlorid	4659-45-4	Acyhalogenid	Kvapalina	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Etyl-2-metylacetoctan	609-14-3	Ketón, ester	Kvapalina	Kategória 2B	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Dusičnan amónny	6484-52-2	Anorganická soľ	Tuhá látka	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka
n-hexán	110-54-3	Uhl'ovodík (acyklický)	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka

Skratky: CASRN = Registračné číslo Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Chemické triedy sa stanovili na každú testovanú látku s použitím štandardnej klasifikačnej schémy na základe klasifikačného systému National Library of Medicine Medical Subject Headings (dostupné na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

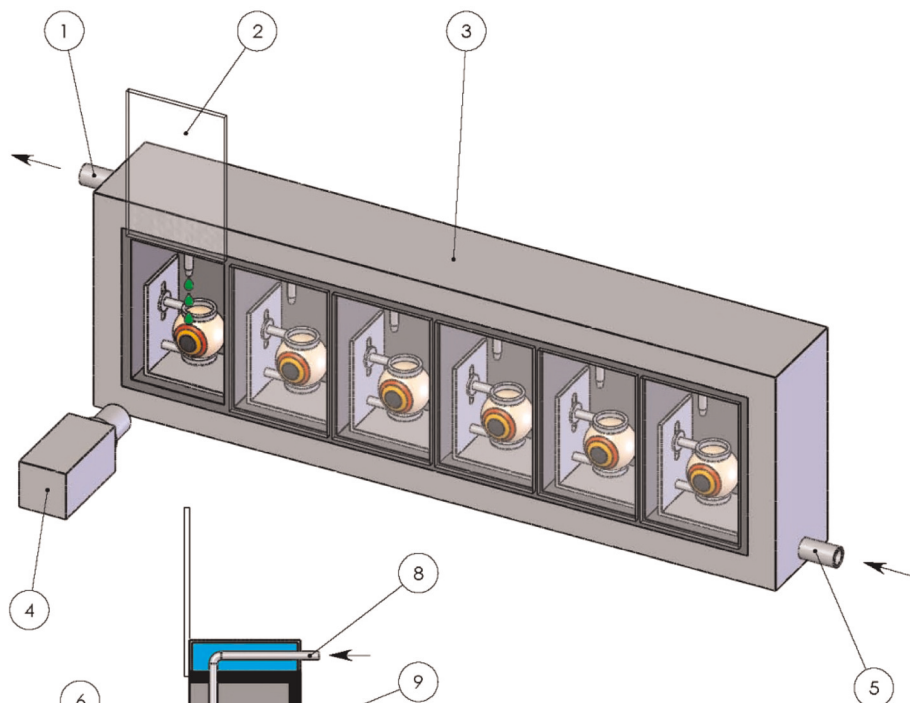
⁽²⁾ Na základe výsledkov testu očí králikov *in vivo* (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (3)(7).

⁽³⁾ Na základe výsledkov testovania zákalu a priepustnosti hovádzkej rohovky a izolovaného kuracieho oka.

Dodatok 3

Schémy superfúzneho prístroja na oči a očných svoriek

[Ďalší generický všeobecný opis superfúzneho prístroja a očnej svorky pozri v publikácii Burton et al. (17)]



PRIEREZ PRIEHRADKY

DRŽIAK OKA

Č. POLOŽKY	OPIS
1	VYPÚŠŤACÍ OTVOR TEPLEJ VODY
2	POSUVNÉ DVIERKA
3	SUPERFÚZNY PRÍSTROJ
4	OPTICKÉ MERACIE ZARIADENIE
5	PLNIACI OTVOR TEPLEJ VODY
6	FYZIOLOGICKÝ ROZTOK
7	TEPLÁ VODA
8	PLNIACI OTVOR FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU
9	PRIEHRADKA
10	DRŽIAK OKA
11	KURACIE OKO
12	VYPÚŠŤACÍ OTVOR FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU
13	NASTAVOVACIA SKRUTKA
14	NASTAVITEĽNÉ HORNÉ RAMENO
15	PEVNÉ DOLNÉ RAMENO