

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 1152/2010**av den 8 december 2010****om ändring, för anpassning till den tekniska utvecklingen, av förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)****(Text av betydelse för EES)**

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA
FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktions-sätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG⁽¹⁾, särskilt artikel 13.3, och

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordning (EG) nr 440/2008⁽²⁾ fastställs testmetoder som ska användas för tillämpning av förordning (EG) nr 1907/2006 när det gäller bestämning av ämnens fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet.
- (2) Det är nödvändigt att uppdatera förordning (EG) nr 440/2008 för att med prioritet införa två nya *in vitro*-testmetoder för ögonirritation som nyligen har antagits

av OECD, i syfte att minska användningen av djur för försöksändamål, i enlighet med rådets direktiv 86/609/EEG av den 24 november 1986 om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål⁽³⁾. Samråd har förts med berörda parter om detta utkast.

- (3) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.
- (4) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats genom artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

I del B i bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska innehållet i bilagan till den här förordningen läggas till som kapitel B.47 och B.48.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 8 december 2010.

På kommissionens vägnar

José Manuel BARROSO

Ordförande

⁽¹⁾ EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ EUT L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ EGT L 358, 18.12.1986, s. 1.

BILAGA

"B. 47 TESTMETODEN BCOP (BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY) FÖR KLASSIFICERING AV ÄMNEN SOM FRÄTANDE ELLER KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN

INLEDNING

1. BCOP-testmetoden är en *in vitro*-testmetod som under vissa omständigheter och med vissa begränsningar kan användas för att klassificera ämnen och blandningar som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen (1) (2) (3). Med kraftigt irriterande för ögonen avses här sådana ämnen som framkallar okulära skador som kvarstår hos kanin under minst 21 dagar efter applicering. Även om BCOP-testmetoden inte anses vara godtagbar som en fullständig ersättning för *in vivo*-ögon-test på kanin, rekommenderas testmetoden som en del av en strategi för stegvis testning när det gäller rättslig klassificering och märkning inom ett visst tillämpningsområde (4) (5). De ämnen och blandningar som testas (6) kan klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen utan ytterligare testning på kaniner. Ett ämne som ger negativt utslag behöver testas på kaniner med en stegvis testningsstrategi enligt OECD:s testriktlinjer 405 (7) (kapitel B.5 i denna bilaga).
2. Syftet är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera potentiellt frätande eller kraftigt irriterande egenskaper hos ett testämne, uppmätta som ämnets förmåga att framkalla opacitet och öka permeabiliteten i en isolerad hornhinna från nötkreatur. De toxiska effekterna på hornhinnan mäts med hjälp av i) minskad ljustransmission (opacitet) och ii) ökad passage av natriumfluorescein (permeabilitet). Bedömningen av hornhinnans opacitet och permeabilitet efter exponeringen för testämnet kombineras till ett IVIS-värde (*In Vitro Irritancy Score*), som används för att klassificera testämnets förmåga att framkalla irritation.
3. Ögonirriterande ämnen som framkallar skador som läker på mindre än 21 dagar och icke-irriterande ämnen har också testats med BCOP-testmetoden. BCOP-testmetodens exakthet och tillförlitlighet i fråga om ämnen i dessa kategorier har dock inte utvärderats formellt.
4. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Testmetoden baserar sig på BCOP-testmetodsprotokollet från amerikanska ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (8), som har tagits fram efter en internationell valideringsstudie (4) (5) (9), med bidrag från Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM). Protokollet baserar sig på uppgifter från IIVS (Institute for In Vitro Sciences) och INVITTOX-protokollet 124 (10), som representerar det protokoll som användes för den förvalideringsstudie av BCOP-test som genomfördes 1997–1998 och sponsrades av Europeiska gemenskapen. Båda dessa protokoll baserar sig på den BCOP-testmetod som först rapporterades av Gautheron m.fl. (11).
6. De identifierade begränsningarna för denna testmetod baserar sig på höga falska positiva värden för alkoholer och ketoner och höga falska negativa värden för fasta ämnen som observerats i valideringsdatabasen (se punkt 44 (5)). När ämnen från dessa kemiska och fysikaliska klasser utesluts ur databasen får man en klart bättre exakthet för BCOP i EU-, EPA- och GHS-klassifikationssystemen (5). Om man ser till syftet med detta test (dvs. att enbart identifiera ämnen som är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen) är falska negativa värden inte kritiska, eftersom sådana ämnen därefter testas på kaniner eller med andra väl validerade *in vitro*-test, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning enligt principen om sammanvägd bedömning. Dessutom gav den aktuella valideringsdatabasen ingen möjlighet till en tillfredsställande utvärdering av vissa kemiska klasser eller produktklasser (t.ex. blandningar). Man kan dock överväga användning av denna testmetod för alla typer av ämnen (inbegripet blandningar) och likaså kan ett positivt resultat godtas som på tecken på att ämnet är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen. Positiva resultat från test med alkoholer eller ketoner bör dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.
7. Alla förfaranden som omfattar ögon och hornhinnor från nötkreatur bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (12).
8. Testmetoden har som begränsning att även om den beaktar vissa av de okulära effekterna som framkallas vid test av ögonirritation hos kanin och i viss utsträckning effekternas allvarlighetsgrad, beaktar den inte skador på konjunktiva eller iris. Dessutom gäller att även om reversibiliteten hos hornhinnaskador i sig inte kan utvärderas med BCOP-test, har det på grundval av studier av kaninögon föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att skilja mellan irreversibla och reversibla effekter (13). Slutligen gäller att BCOP inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

9. Det pågår arbete för att ytterligare karakterisera BCOP-testmetodens användbarhet och begränsningar när det gäller att identifiera ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande (se också punkt 45). Användarna uppmuntras också att lämna uppgifter om prover och/eller data till valideringsorganisationer för formell utvärdering av eventuella framtida användningar av BCOP-testmetoden, även när det gäller identifiering av ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande.
10. Laboratorier som tar testmetoden i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i tillägg 2. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra BCOP-test innan det lämnar in BCOP-testdata avsedda för lagenlig faroklassificering.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. BCOP-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken hornhinnan från nötkreatur under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion *in vitro*. Testmetoden innebär att skador framkallade av testämnet bedöms med kvantitativa mätningar av ändringar i korneal opacitet och permeabilitet med opacitetsmätare respektive spektrofotometer för synligt ljus. Med hjälp av resultaten från de två mätningarna beräknas ett IVIS-värde som används för att bestämma en *in vitro*-klassificering av farokategori för prognos av testämnets potential att framkalla ögonirritation *in vivo* (se beslutskriterierna).
12. För BCOP-testmetoden används isolerade hornhinnor från ögon som tillvaratagits från nyligen slaktade nötkreatur. Den korneala opaciteten mäts kvantitativt som ljustransmissionen genom hornhinnan. Permeabiliteten mäts kvantitativt som mängden natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans hela djup enligt mätning i mediet i hornhinnehållarens bakre kammare. Testämnena appliceras på hornhinnans epitelyta via den främre kammaren. I tillägg 3 finns en beskrivning och en schematisk bild av den hornhinnehållare som används vid BCOP-testmetoden. Hornhinnehållare finns att köpa på marknaden hos olika leverantörer eller kan konstrueras i laboratoriet.

Källa och ålder för ögon från nötkreatur, val av djurart

13. Nötkreatur som sänds till slakterier avlivas i regel för användning som livsmedel eller för andra kommersiella ändamål. Endast friska djur som anses vara lämpliga för användning i livsmedelskedjan får användas för tillvaratagande av hornhinnor som används vid BCOP-testmetoden. Eftersom nötkreaturens vikt kan variera stort beroende på ras, ålder och kön finns det ingen rekommenderad slaktvikt för de djur som används.
14. Hornhinnornas dimensioner kan variera beroende på djurens ålder. Hornhinnor med en horisontell diameter $> 30,5$ mm och en central hornhinnetjocklek (CCT) $\geq 1\,100$ μm kommer i regel från nötkreatur som är äldre än åtta år, medan hornhinnor med en horisontell diameter $< 28,5$ mm och CCT < 900 μm i regel kommer från nötkreatur som är yngre än fem år (14). Därför används normalt inte ögon från nötkreatur som är äldre än 60 månader. Ögon från nötkreatur som är yngre än 12 månader används i regel inte eftersom ögonen fortfarande håller på att utvecklas och hornhinnans tjocklek och diameter är betydligt mindre än de värden som rapporteras för ögon från vuxna nötkreatur. Hornhinnor från unga djur (6–12 månader) får dock användas eftersom det medför vissa fördelar såsom bättre tillgänglighet, smalare åldersintervall och lägre risker för att de anställda exponeras för bovin spongiform encefalopati (15). Det vore värdefullt med ytterligare utvärdering av hur hornhinnans storlek eller tjocklek påverkar responsen från frätande och irriterande ämnen, och därför uppmanas användarna att rapportera uppskattad ålder och/eller vikt för de djur vars hornhinna använts för undersökningen.

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

15. Ögonen tas till vara av slakteriets personal. För att minimera mekaniska och andra typer av skador på ögonen bör dessa tas till vara så snart som möjligt efter slakten. För att hindra att ögonen exponeras för potentiellt irriterande ämnen bör rengöringsmedel inte användas vid sköljning av djurets huvud vid slakteriet.
16. Ögonen bör hållas helt nedsänkta i HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) i ett kärl av lämplig storlek, och transporteras till laboratoriet på sådant sätt att skador och/eller bakterieförorening minimeras. Eftersom ögonen tas till vara under slaktningen utsätts de eventuellt för blod och andra biologiska ämnen, inbegripet bakterier och andra mikroorganismer. Det är därför viktigt att minimera föroreningsrisken (t.ex. genom att hålla kärlet med ögonen på krossad is eller lägga till antibiotika i HBSS-förvaringslösningen, t.ex. 100 IU/ml penicillin eller 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin).
17. Tiden mellan tillvaratagande av ögonen och användningen av hornhinnorna i BCOP-test bör minimeras (normalt bör tillvaratagande och användning ske inom samma dag) och det måste påvisas att väntetiden inte stör analysresultaten. Dessa baserar sig på urvalskriterierna för ögonen såväl som positiv och negativ kontrollrespons. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits en viss dag.

Urvalskriterier för ögon som används för BCOP-test

18. När ögonen har tagits emot vid laboratoriet ska de undersökas omsorgsfullt för skador såsom ökad opacitet, repor och nykärlsbildning. Endast hornhinnor från oskadade ögon får användas.
19. De individuella hornhinnornas kvalitet utvärderas också i senare steg i testningen. Hornhinnor vars opacitet efter en inledande jämviktsperiod på en timme är högre än sju opacitetsenheter ska förkastas (OBS: opacitetsmätaren ska kalibreras med opacitetsstandarder för opacitetsenheter, se tillägg 3).
20. Varje behandlingsgrupp (testämne, parallella negativa och positiva kontroller) ska bestå av minst tre ögon. För den negativa kontrollen vid BCOP-testning ska tre hornhinnor användas. Eftersom hornhinnorna skärs ut från globen som helhet och därefter monteras i hornhinnekamrarna, finns det en risk för att de individuella värdena för korneal opacitet och permeabilitet (inbegripet negativ kontroll) påverkas av artefakter från hanteringen. Vidare används opacitets- och permeabilitetsvärden från de negativa kontrollernas hornhinnor för att korrigera de opacitets- och permeabilitetsvärden från testade och positivkontrollerade hornhinnor som används för IVIS-beräkningarna.

FÖRFARANDE**Förberedning av ögonen**

21. Defektfria hornhinnor skärs ut med en 2–3 mm omgivande kant av senhinna som är avsedd att underlätta efterföljande hantering. Var noga med att undvika skador på hornhinnans epitel och endotel. Hornhinnorna monteras en och en i särskilt utformade hornhinnehållare som har en bakre och en främre kammare som angränsar mot hornhinnans epitelsida respektive endotelsida. Båda kamrarna fylls med förvämt EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) i överskott (bakre kammaren först). Se till så att det inte bildas bubblor. Därefter hålls utrustningen vid $32 \pm 1^\circ\text{C}$ i minst en timme så att jämvikt nås mellan mediet och hornhinnorna och normal metabolisk aktivitet uppstår i den mån det är möjligt (en hornhinna *in vivo* har en ungefärlig temperatur på 32°C).
22. Efter jämviktsperioden tillsätts färskt förvämt EMEM till båda kamrarna och grundvärden för opacitet mäts på varje hornhinna. Alla hornhinnor som uppvisar en makroskopisk vävnadsskada (t.ex. repor, pigmentering, kärlnybildning) eller opacitet över 7 opacitetsenheter ska förkastas. Opacitetsmedelvärdet beräknas för alla jämviktsbehandlade hornhinnor. Minst tre hornhinnor med opacitetsvärden nära medianvärdet för alla hornhinnor väljs ut som exemplar för negativa kontroller (eller lösningsmedelskontroller). Återstående hornhinnor delas upp i behandlingsgrupp och positiv kontrollgrupp.
23. Eftersom vatten har en högre värmekapacitet än luft, ger vatten stabilare temperaturförhållanden för inkubation. Därför rekommenderas vattenbad för att hålla hornhinnehållaren och dess innehåll vid $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Luftinkubatorer kan dock också användas under förutsättning att temperaturen hålls stabil (t.ex. genom förvärmning av hållare och media).

Applicering av testämnet

24. Två olika behandlingsprotokoll används, ett för vätskor och ytaktiva ämnen (fasta eller flytande) och ett för fasta ämnen som inte är ytaktiva.
25. Vätskor testas i utspädd form, medan ytaktiva ämnen testas vid en koncentration på 10 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. Halvfasta ämnen, krämer och vaxer testas normalt som vätskor. Om andra utspädningskoncentrationer används bör detta motiveras. Hornhinnorna exponeras för vätskor och ytaktiva ämnen under 10 minuter. Om avvikande exponeringstider används bör tillbörlig vetenskaplig motivering ges.
26. Fasta ämnen som inte är ytaktiva testas normalt som lösningar eller suspensioner vid 20 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. I vissa förhållanden och med angivande av tillbörlig vetenskaplig motivering kan fasta ämnen också testas i ren form med direkt applicering på hornhinnans yta med användning av metoden med öppen kammare (se punkt 29). Hornhinnorna exponeras för fasta ämnen under fyra timmar, och på samma sätt som med vätskor och ytaktiva ämnen måste avvikande exponeringstider motiveras med tillbörliga vetenskapliga grunder.
27. Olika behandlingsmetoder kan användas, beroende på testämnets fysikaliska natur och kemiska egenskaper (t.ex. fasta ämnen, vätskor och viskösa respektive icke-viskösa vätskor). Den kritiska faktorn är att se till att testämnet täcker epitelytan tillräckligt och att det avlägsnas effektivt under sköljningsstegen. Metoden med slutna kammare används normalt vid testning av icke-viskösa till lätt viskösa vätskor, medan metoden med öppen kammare normalt används för semiviskösa och viskösa vätskor och rena fasta ämnen.

28. När sluten kammare används tillförs testämnet i den främre kammaren genom doseringshålen på kammarens övre yta i tillräcklig mängd (750 µl) för att täcka hornhinnans epitelsida och därefter hålls hålen förslutna med pluggar under exponeringen. Det är viktigt att varje hornhinna exponeras för testämnet under avsedd tidslängd.
29. När öppen kammare används ska den främre kammarens fönsterlåsring och glasfönster avlägsnas före behandlingen. Kontroll- eller testämne (750 µl eller tillräckligt för att täcka hornhinnan helt) tillförs direkt på hornhinnans epitelyta med hjälp av en mikropipett. Om testämnet är svårt att pipettera kan det i stället appliceras med en s.k. positive displacement-pipett. Positive displacement-pipettens spets införs i sprutans doseringsspets så att ämnet kan tryckas in i positive displacement-spetsen. Samtidigt dras sprutkolven ut medan pipettens pistong dras uppåt. Om det uppstår bubblor i pipettspetsen ska testämnet avlägsnas (tryckas ut) och förfarandet upprepas till dess att spetsen fylls utan att det uppstår luftbubblor. Vid behov kan man använda en vanlig spruta (utan nål) eftersom den ger möjlighet att mäta en exakt volym av testämnet och underlättar appliceringen på hornhinnans epitelyta. Efter doseringen monteras glasfönstret tillbaka på den främre kammaren så att systemet återförsluts.

Inkubation efter exponering

30. Efter exponeringsperioden avlägsnas testämnet, eller ämnet som används för negativ eller positiv kontroll, från den främre kammaren och epitelytan tvättas minst tre gånger (eller till dess att inget testämne kan observeras visuellt på ytan) med EMEM (med fenolrött). Medium innehållande fenolrött används för sköljning eftersom färgändringen av fenolrött kan användas som indikator på effektiv sköljning av sura eller alkaliska material. Hornhinnorna ska tvättas mer än tre gånger om färgförändringen av fenolrött kvarstår (gult eller purpurrött) eller om rester av testämnet kan observeras. När mediet är rent från testämne görs en slutsköljning av hornhinnorna med EMEM (utan fenolrött). EMEM (utan fenolrött) används som slutsköljning för att säkerställa att allt fenolrött avlägsnas från den främre kammaren före opacitetsmätningen. Därefter fylls den främre kammaren på nytt med färskt EMEM utan fenolrött.
31. För vätskor och ytaktiva ämnen ska hornhinnorna efter sköljning inkuberas i ytterligare två timmar vid 32 ± 1 °C. Längre tider kan vara till fördel under vissa omständigheter och kan övervägas från fall till fall. Hornhinnor som exponerats för fasta ämnen sköljs grundligt efter den fyra timmar långa exponeringen och kräver ingen efterföljande inkubation.
32. Efter den inkubationsperiod som följer på exponeringen (vätskor och ytaktiva ämnen) eller efter slutet av den fyra timmar långa exponeringsperioden (icke-ytaktiva fasta ämnen) görs mätningar av opaciteten och permeabiliteten för varje hornhinna. Varje hornhinna granskas också visuellt och relevanta observationer noteras (t.ex. avflagnings av vävnad, rester av testämne, oenhetliga opacitetsmönster). Sådana observationer kan vara viktiga eftersom de också är kopplade till variationer av opacitetsmätarens avläsningar.

Kontrollämnena

33. Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ingår i varje försök.
34. Vid testning av ett vätskeformigt ämne vid 100 % ska BCOP-testmetoden inbegripa en parallell negativ kontroll (t.ex. 0,9 % natriumkloridlösning eller destillerat vatten) så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens resultatmätt. På så sätt säkerställs också att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.
35. Vid testning av en utspädd vätska, ett ytaktivt ämne eller ett fast ämne ska BCOP-testmetoden omfatta en parallell kontrollgrupp med lösningsmedel/vehikel så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens resultatmätt. Endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet får användas.
36. Ett känt ögonirriterande ämne ska ingå som parallell positiv kontroll i varje försök för att bekräfta att rätt slags respons framkallas. Eftersom BCOP används i denna testmetod för att identifiera frätande eller kraftigt irriterande ämnen ska den positiva kontrollen helst göras med ett referensämne som framkallar kraftig respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsen kan bedömas över tiden bör den irritation som framkallas inte vara för stark.
37. Exempel på positiva kontrollämnena för testning av vätskor är dimetylformamid eller 1 % natriumhydroxid. Exempel på ett positivt kontrollämne för testning av fasta ämnen är 20 % (vikt/volym) imidazol i 0,9 % natriumkloridlösning.

38. Referensämnen kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av resultatmått

39. Opaciteten bestäms enligt ljustransmissionen genom hornhinnan. Hornhinnans opacitet mäts kvantitativt med hjälp av en opacitetsmätare som mäter opacitetsvärden på en kontinuerlig skala.
40. Permeabiliteten bestäms med hjälp av mängden natriumfluorescein som passerar hela hornhinnan (dvs. epitelet på hornhinnans yttre yta och genom hornhinnan till endotelet på hornhinnans inre yta). 1 ml natriumfluoresceinlösning (4 eller 5 mg/ml vid testning av vätskor och ytaktiva ämnen respektive icke-ytaktiva fasta ämnen) tillförs hornhinnhållarens främre kammare (den som angränsar mot hornhinnans epitelsida) medan den bakre kammaren (den som angränsar mot hornhinnans endotelsida) fylls med färskt EMEM. Därefter inkuberas hållaren i horisontellt läge i 90 ± 5 minuter vid 32 ± 1 °C. Mängden natriumfluorescein som kommer in i den bakre kammaren mäts kvantitativt med hjälp av UV/VIS-spektrofotometri. De spektrofotometriska mätningarna vid 490 nm noteras som optisk densitet (OD_{490}) eller absorbansvärden som mäts på en kontinuerlig skala. Permeabilitetsvärdena för fluorescein bestäms genom OD_{490} -värden med en spektrofotometer för synligt ljus och en standardväglängd på 1 cm.
41. Alternativt kan man använda en 96-håls mikrotiterplatta förutsatt att i) det linjära området för avläsning av plattan när det gäller fluorescein OD_{490} -värden kan fastställas och ii) korrekt volym fluoresceinprover används i mikrotiterplattan för att få OD_{490} -värden som motsvarar standardväglängden 1 cm (för detta krävs eventuellt att brunnen är helt full, i regel 360 l).

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

42. När opacitetsvärdena och permeabilitetsmedelvärdena (OD_{490}) har korrigerats för bakgrundsopacitet och den negativa kontrollens permeabilitetsvärden OD_{490} , ska varje behandlingsgrupps medelvärden för opacitet och permeabilitet OD_{490} kombineras i en empiriskt härledd formel för beräkning av IVIS-värdet (*In Vitro Irritancy Score*) enligt följande:

$$IVIS = \text{medelvärdet för opacitet} + (15 \times \text{medelvärdet för permeabilitet } OD_{490})$$

Sina m.fl. (16) har rapporterat att denna formel härleddes under försök som utfördes inom och mellan laboratorier. Data som genererades för en serie med 36 föreningar i en undersökning som omfattade flera laboratorier användes som indata i en multivariat analys för bestämning av vilken ekvation som ger den bästa anpassningen mellan in vivo- och in vitro-data. Analysen genomfördes av forskare hos två separata företag och de resulterande ekvationerna var nästan identiska.

43. Opacitets- och permeabilitetsvärdena bör också utvärderas fristående för att fastställa huruvida ett testämne har en frätande eller kraftigt irriterande verkan endast genom ett av de två resultatmått (se beslutskriterierna).

Beslutskriterier

44. Ett ämne som framkallar $IVIS \geq 55,1$ definieras som ett frätande ämne eller kraftigt irriterande ämne. Som det konstateras i punkt 1 i fråga om testämnen som inte identifieras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen bör ytterligare testning genomföras för klassificerings- och märkningsändamål. BCOP-testmetoden har en övergripande exakthet på 79 % (113/143) till 81 % (119/147), falska positiva värden på 19 % (20/103) till 21 % (22/103) och falska negativa värden på 16 % (7/43) till 25 % (10/40) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassifikationssystemen EPA (1), EU (2) eller GHS (3). När ämnen inom en viss kemikalieklass (t.ex. alkoholer eller ketoner) eller fysikalisk klass (t.ex. fasta ämnen) utesluts ur databasen, sträcker sig exaktheten hos BCOP inom klassifikationssystemen EU, EPA, och GHS från 87 % (72/83) till 92 % (78/85), falska positiva värden från 12 % (7/58) till 16 % (9/56) och falska negativa värden från 0 % (0/27) till 12 % (3/26).
45. Även om ett testämne inte klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen kan data från BCOP vara användbara i kombination med testdata från in vivo-test på kaninögon eller tillbörligt validerade in vitro-test, för vidare utvärdering av användbarheten och begränsningarna för BCOP-testmetoden när det gäller att identifiera ämnen som inte framkallar kraftig irritation eller som inte alls framkallar irritation (en vägledning om användning av in vitro-test för ögontoxicitet håller på att utarbetas).

Kriterier för godkännande av ett försök

46. Ett försök anses vara godkänt om den positiva kontrollen ger ett IVIS-värde som faller inom två standardavvikelser för det aktuella historiska medelvärdet, som måste uppdateras minst var tredje månad, eller varje gång ett godkänt test genomförs i laboratorier där försök genomförs oregelbundet (mindre än en gång per månad). Responsen från den negativa kontrollen eller lösningsmedels-/vehikelkontrollen bör ge opacitets- och permeabilitetsvärden som är lägre än de fastställda övre gränserna för bakgrundsvärden för opacitet och permeabilitet för nötkreaturshornhinnor behandlade med negativa kontrollämnen eller lösningsmedel/vehikler.

Testrapport

47. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Test- och kontrollämnen

Kemiskt namn (kemiska namn) såsom det strukturella namn som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända namn.

CAS-registernummer (RN), om det är känt.

Ämnets eller blandningens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.

Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Angivelse av ögonkällan (den anläggning där ögonen togs till vara).

Förvarings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tidpunkt för tillvaratagande, tidsperiod före inledning av försöket, transportmedium och temperaturförhållanden, eventuella antibiotika som använts).

Om möjligt specifika egenskaper för de djur från vilka ögonen togs till vara (t.ex. ålder, kön, vikt).

*Motivering för den testmetod och det protokoll som använts**Testmetodens integritet*

Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. exakthet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning av kvalifikationsämnen, användning av historiska data från negativa och positiva kontroller).

Kriterier för godtagbart försök

Godtagbara intervaller för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data.

Om tillämpligt, godtagbara intervaller för parallella referenskontroller på grundval av historiska data.

Försöksförhållanden

Beskrivning av testsystemet.

Typ av hornhinnebehållare.

Kalibreringsinformation för utrustning som använts för mätning av opacitet och permeabilitet (t.ex. opacitetsmätare och spektrofotometer).

Uppgifter om de nötkreaturshornhinnor som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet.

Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

Testämneskoncentration(er).

Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Hänvisningar till modellens historiska data (t.ex. negativa och positiva kontroller, kvalifikationsämnen, referensämnen).

Beskrivning av utvärderingskriterierna.

Resultat

Data i tabellform för enskilda testprover (t.ex. opacitet och OD₄₉₀-värden och beräknade IVIS-värden för testämnet och de positiva och negativa kontrollerna samt referenskontroller om sådana ingått, inbegripet data från replikat och upprepade försök, beroende på vad som är lämpligt, och medelvärden inklusive standardavvikelse för varje försök).

Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

- (1) U.S. EPA (1996), Label Review Manual, andra utgåvan, EPA737-B-96-001, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency.

- (2) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006, EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

- (3) FN (2007), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, New York och Genève, FN:s publikationer, 2007, finns på

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, finns på

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

- (5) ICCVAM (2007), Test Method Evaluation Report – In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

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

- (6) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

- (7) OECD (2002), Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion, finns på

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

- (8) ICCVAM (2007), ICCVAM:s rekommenderade testprotokoll för BCOP-testmetoden, "ICCVAM Test Method Evaluation Report – In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives", Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

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

- (9) ICCVAM (2006), Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, NIH:s publikation nr: 06-451, Research Triangle Park: National Toxicology Program, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

- (10) INVITTOX (1999), Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd, Ispra, Italien; Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM).

- (11) P. Gautheron, M. Dukic, D. Alix och J. F. Sina (1992), "Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18:442–449.

- (12) J. D. Siegel, E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello och Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, finns på

<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>

- (13) J. K. Maurer, R. D. Parker och J. V. Jester (2002), "Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays", *Reg. Tox. Pharmacol.*, 36:106–117.

- (14) M. J. Doughty, S. Petrou och H. Macmillan (1995), "Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse", *Can. J. Zool.* 73:2159–2165.

- (15) J. Collee och R. Bradley (1997), "BSE: A decade on – Part I", *The Lancet* 349: 636–641.

- (16) J. F. Sina, D. M. Galer, R. S. Sussman, P. D. Gautheron, E. V. Sargent, B. Leong, P. V. Shah, R. D. Curren och K. Miller (1995), "A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates", *Fundam Appl Toxicol* 26:20–31.

- (17) ICCVAM (2006), Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method, finns på

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, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

Tillägg 1

DEFINITIONER

exakthet: mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat som fås med en testmetod.

referensämne: ett ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikaliska/kemiska egenskaper, iv) stödande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för ett testämne. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan. Opaciteten kan utvärderas subjektivt (Draizes test på kaninögon) eller objektivt med ett instrument såsom en opacitetsmätare.

korneal permeabilitet: kvantitativt mått på skada på hornhinnans epitel genom bestämning av den mängd natrium-fluorescein som passerar genom hornhinnans alla cellager.

EPA-kategori 1: frätande (irreversibel skada på okulär vävnad) eller kornealpåverkan eller irritation som varar mer än 21 dagar (1).

EU-kategori R41: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2).

falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativa. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnens skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (3).

GHS-kategori 1: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (3).

farä: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

In Vitro Irritancy Score (IVIS): en empiriskt härledd formel som används vid BCOP-test och där medelvärdet för opacitet och medelvärdet för permeabilitet för varje behandlingsgrupp kombineras till ett enda *in vitro*-värde. IVIS = medelvärdet för opacitet + (15 x medelvärdet för permeabilitet)

negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras parallellt med testämneshandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

icke-irriterande: ämnen som inte klassificeras som ögonirriterande ämnen enligt EPA-kategori I, II, eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B.

frätande för ögonen: a) ett ämne som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) ämnen som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

irriterande för ögonen: a) ett ämne som orsakar en reversibel ändring på ögat efter applicering på ögats främre yta, b) ämnen som klassificeras som irriterande för ögonen enligt EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

kraftigt irriterande för ögonen: a) ett ämne som efter applicering på ögats främre yta orsakar vävnadsskada på ögat som inte har läkt inom 21 dagar efter appliceringen eller som orsakar kraftig synnedsättning, b) ämnen som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

opacitetsmätare: ett instrument för mätning av korneal opacitet genom en kvantitativ utvärdering av ljustransmissionen genom hornhinnan. Det har i regel två kamrar med var sin ljuskälla och var sin fotocell. Ena kammaren används för den behandlade hornhinnan och den andra används för kalibrering och nollställning av instrumentet. Ljus från en halogen-lampa sänds genom kontrollkammaren (som är tom, utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display.

positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer över tiden kan bedömas, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln och som behandlas parallellt med testämnesbehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlats med testämnet upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

stegvis testning: En strategi för stegvis testning där all befintlig information om ett testämne granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (*weight of evidence*) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testämnets förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testämnets förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills det går att fastställa en otvetydig klassificering.

validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål

sammanvägd bedömning: (*weight of evidence*) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande ett ämnes faropotential.

Tillägg 2

Kvalifikationsämnen för BCOP-testmetoden

Innan denna testmetod används rutinmässigt kan laboratoriet vilja påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av frätande verkan på ögonen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för lokal ögonirritation/frätande verkan enligt resultaten från *in vivo*-test på kaninögon (TG 405), dvs. kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering och märkning enligt FN GHS (3) (7). Med beaktande av det validerade ändamålet för dessa test (endast för identifiering av ämnen som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen) finns det dock bara två testutslag för klassificeringsändamål (frätande/kraftigt irriterande eller icke-frätande/icke kraftigt irriterande för ögonen) när det gäller att demonstrera kvalitet. Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till *in vivo*-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från de två *in vitro*-metoder för vilka testriktlinjer håller på att utarbetas. Därför valdes irriterande ämnen från ICCVAM:s förteckning med 122 referensämnen för validering av *in vitro*-testmetoder för okulär toxicitet (se tillägg H). Referensdata finns i ICCVAM Background Review Document för testmetoderna BCOP och ICE (17) (18).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet hos BCOP

Ämne	CASRN	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	<i>In vivo</i> -klassificering ⁽²⁾	<i>In vitro</i> -klassificering ⁽³⁾
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
2,6-Diklorbensoylklorid	4659-45-4	Acylohalid	Vätska	Kategori 2A	Ikke-frätande/Ikke kraftigt irriterande
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2B	Ikke-frätande/Ikke kraftigt irriterande
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2A	Ikke-frätande/Ikke kraftigt irriterande
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen märkning	Ikke-frätande/Ikke kraftigt irriterande
n-hexan	110-54-3	Kolväte (acykliskt)	Vätska	Ingen märkning	Ikke-frätande/Ikke kraftigt irriterande

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

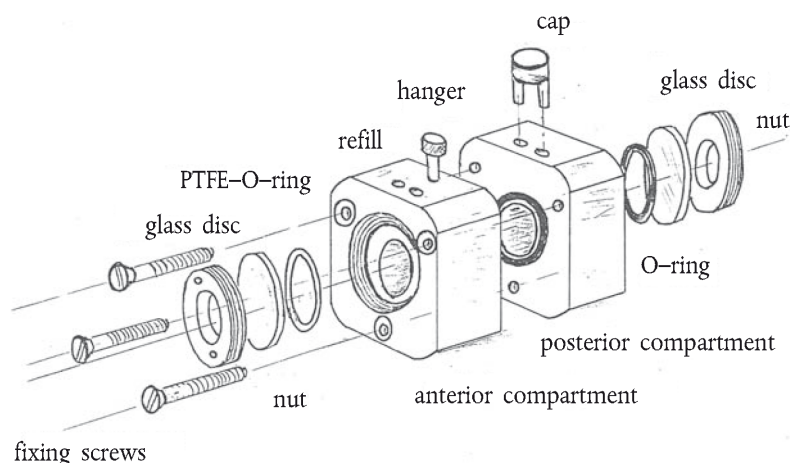
⁽¹⁾ De kemiska klasserna tilldelades vart och ett testämne med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ På grundval av *in vivo*-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av FN GHS (3) (7).⁽³⁾ På grundval av resultat i BCOP och ICE.

Tillägg 3

HORNHINNEHÅLLARE FÖR BCOP-TESTMETODEN

1. Hornhinnehållare för BCOP är gjorda av ett inert material (t.ex. polypropen). De består av två halvor (en främre och en bakre kammare) och har två likadana cylindriska inre kammare. Varje kammare rymmer 5 ml och har ett glasfönster genom vilket opacitetsmätningarna görs. De inre kamrarna mäter 1,7 cm i diameter och 2,2 cm i djup ⁽¹⁾. Den bakre kammaren har en o-ring för att förhindra läckor. Hornhinnorna placeras med endotelsidan nedåt på den bakre kammarens o-ring och den främre kammaren placeras på hornhinnornas epitelsida. Kamrarna hålls på plats med hjälp av tre rostfria skruvar på kammarens ytterkanter. Varje kammare har ett glasfönster som kan tas bort för att enkelt nå hornhinnan. Det finns också en o-ring mellan glasfönstret och kammaren för att förhindra läckor. Upptill på varje kammare finns två hål för att tillsätta och ta bort medium och testämne. Hålen försluts med gummiproppar under behandlings- och inkubationsperioderna.

⁽¹⁾ De här måtten utgår från hållare för hornhinnor från nötkreatur som är 12–60 månader gamla. För hornhinnor från djur som är 6–12 månader ska hållarna utformas så att varje kammare rymmer en volym på 4 ml och innerkamrarnas diameter är 1,5 cm och djup 2,2 cm. Vid utformningen av anpassade hornhinnehållare är det mycket viktigt att förhållandet mellan exponerad hornhinneyta och bakre kammarens volym är samma som motsvarande förhållande i en traditionell hornhinnehållare. Detta är nödvändigt för att säkerställa att permeabilitetsvärdena fastställs korrekt för beräkningen av IVIS med hjälp av den angivna formeln.



Ordlista

Glass disc: Glasskiva

PTFE-O-ring: O-ring av PTFE

Refill: Påfyllning

Hanger: Hängare

Cap: Propp

Nut: Låsring

O-ring: O-ring

Posterior compartment: Bakre kammare

Anterior compartment: Främre kammare

Fixing screws: Fästskruvar

OPACITETSMÄTAREN

2. Opacitetsmätaren används för mätning av ljustransmission. Ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (en tom kammare utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display. Opacitetsenheter fastställs.
3. Opacitetsmätaren bör ge en linjär respons genom ett område av opacitetsmätningar som omfattar de brytpunkter som används för de olika klassifikationerna som beskrivs i prognosmodellen (dvs. upp till brytpunkten för frätande verkan/kraftig irritation). För att säkerställa linjära och exakta avläsningar upp till 75–80 opacitetsenheter är det nödvändigt att kalibrera opacitetsmätaren med en serie kalibratorer. Kalibratorerna (opaka polyesterark) placeras i kalibreringskammaren (en hornhinnekammare utformad för kalibratorer) och avläsning görs på opacitetsmätaren. Kalibratorerna placeras i kalibreringskammaren med mer eller mindre det avstånd mellan ljus och fotocell som motsvarar hornhinnans placering vid opacitetsmätningarna. Opacitetsmätaren kalibreras först till 0 opacitetsenheter genom att göra en avläsning utan kalibrator. Därefter placeras tre olika kalibratorer en i sänder i kalibreringskammaren och avläsning görs av opacitetsvärdena. Kalibratorerna 1, 2 och 3 bör ge opacitetsavläsningar som motsvarar deras riktvärden på 75, 150 respektive 225 opacitetsenheter $\pm 5\%$.

B 48 TESTMETODEN ICE (ISOLATED CHICKEN EYE TEST) FÖR IDENTIFIERING AV ÄMNEN SOM ÄR FRÄTANDE OCH KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN**INLEDNING**

1. ICE-testmetoden är en *in vitro*-testmetod som under vissa omständigheter och med vissa begränsningar kan användas för att klassificera ämnen och blandningar som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen (1) (2) (3). Med kraftigt irriterande för ögonen avses här sådana ämnen som framkallar okulära skador som kvarstår hos kanin under minst 21 dagar efter applicering. Även om ICE-testmetoden inte anses vara godtagbar som en fullständig ersättning för *in vivo*-ögon-test på kanin, rekommenderas testmetoden som en del av en strategi för stegvis testning när det gäller rättslig klassificering och märkning inom ett visst tillämpningsområde (4) (5). De testämnen och blandningar (6) som ger positiv respons med detta test kan klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen utan ytterligare testning på kaniner. Ett ämne som ger negativt utslag behöver testas på kaniner med en stegvis testningsstrategi enligt OECD:s testriktlinjer 405 (7) (kapitel B.5 i denna bilaga).
2. Syftet är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera potentiellt frätande eller kraftigt irriterande egenskaper hos ett testämne, uppmätta som ämnets förmåga att framkalla toxiska verkningar i ett isolerat kyckling-öga. De toxiska verkningarna på hornhinnan mäts genom i) kvalitativ bedömning av opacitet, ii) kvalitativ bedömning av skadan på epitel efter applicering av fluorescein på ögat (fluoresceinfärgning), iii) kvantitativ mätning av ökad tjocklek (svullnad) och iv) kvalitativ utvärdering av makroskopisk morfologisk skada på ytan. Korneal opacitet, svullnad och skadebedömning efter exponering för ett testämne utvärderas var för sig och kombineras till ett resultat som används för klassificering av ämnet med avseende på ögonirritation.
3. Ögonirriterande ämnen som framkallar skador som läker på mindre än 21 dagar och icke-irriterande ämnen har också testats med ICE-testmetoden. ICE-testmetodens exakthet och tillförlitlighet i fråga om ämnen i dessa kategorier har dock inte utvärderats formellt.
4. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Testmetoden baserar sig på ICE-testmetodsprotokollet från amerikanska ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (8) som har tagits fram efter en internationell valideringsstudie (4) (5) (9), med bidrag från Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) och TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederländerna). Protokollet grundar sig på uppgifter från offentliggjorda protokoll och från det protokoll som för närvarande används av TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. De identifierade begränsningarna för denna metod baserar sig på falska positiva värden för alkoholer och falska negativa värden för fasta och ytaktiva ämnen (se punkt 47) (4). När ämnen från dessa kemiska och fysikaliska klasser utesluts ur databasen får man en klart bättre exakthet för ICE i EU-, EPA- och GHS-klassifikationssystemen (4). Om man ser till syftet med detta test (dvs. att enbart identifiera ämnen som är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen) är falska negativa värden inte kritiska, eftersom sådana ämnen därefter testas på kaniner eller med andra tillbörligt validerade *in vitro*-test, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning och enligt principen om sammanvägd bedömning. Dessutom gav den aktuella valideringsdatabasen ingen möjlighet till en tillbörlig utvärdering av vissa kemiska klasser eller produktklasser (t.ex. blandningar). Man kan dock överväga användning av denna testmetod för alla typer av ämnen (inbegripet blandningar) och likaså kan ett positivt resultat godtas som på tecken på att ämnet är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen. Positiva resultat från test med alkoholer bör dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.
7. Alla förfaranden som omfattar ögon från kycklingar bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från människor eller djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (15).
8. Testmetoden har som begränsning att även om den beaktar vissa av de okulära effekterna som framkallas vid test av ögonirritation hos kanin och i viss utsträckning effekternas allvarlighetsgrad, beaktar den inte skador på konjunktiva eller iris. Dessutom gäller att även om reversibiliteten hos hornhinneskador i sig inte kan utvärderas vid ICE-test, har det på grundval av studier av kaninögon föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att skilja mellan irreversibla och reversibla effekter (16). Slutligen gäller att ICE inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.
9. Det pågår arbete för att ytterligare karakterisera ICE-metodens användbarhet och begränsningar när det gäller att identifiera ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande (se också punkt 48). Användarna uppmuntras också att lämna uppgifter om arter och/eller data till valideringsorganisationer för formell utvärdering av eventuella framtida användningar av ICE-testmetoden, även när det gäller identifiering av ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande.

10. Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i bilaga 2. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra ICE-testmetoden innan laboratoriet lämnar in ICE-testdata avsedda för lagenlig faroklassificering.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. ICE-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken kycklingögon under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion *in vitro*. Med denna testmetod utvärderas den skada som framkallats av testämnet genom bestämning av hornhinnans svullnad, opacitet och fluoresceinfärgning. De två senare parametrarna bedöms kvalitativt medan analysen av hornhinnans svullnad görs kvantitativt. Varje mätning konverteras till ett kvantitativt värde som används för att kalkylera ett övergripande irritationsindex eller för att tilldela en kvalitativ kategorisering som används för att fastställa klassificeringen av frätande verkan och kraftig irritation för ögonen *in vitro*. Ettdera resultatet kan därefter användas för att göra en prognos om testämnets potential att ge frätskador eller kraftig irritation på ögat *in vivo* (se beslutskriterierna).

Källa och ålder för kycklingögon

12. I regel används ögon tillvaratagna från kycklingar som kommer från ett slakteri där de avlivats för användning som livsmedel, vilket eliminerar behovet av försöksdjur. Endast ögon från friska djur som anses lämpliga för livsmedelkedjan får användas.
13. Det har inte gjorts någon kontrollerad undersökning för att utvärdera optimal ålder för kycklingarna för testmetoden, men i regel används kycklingar som slaktats på vanligt sätt i ett fjäderfäslakteri (cirka 7 veckor gamla, 1,5–2,5 kg).

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

14. Kycklingarnas huvuden ska avlägsnas omedelbart efter bedövning (i regel med elchock) med snitt i halsen för blödning. Kycklinghuvudena bör komma från en lokal källa nära laboratoriet så att de tillräckligt snabbt kan transporteras från slakteriet till laboratoriet för att minimera risken för skador och/eller bakterieförening. Tidsintervallet mellan tillvaratagandet av kycklinghuvudena och användningen av ögonen för ICE-test ska minimeras (i regel högst två timmar) och det bör påvisas att transporttiden inte stör testresultaten. Dessa baserar sig på urvalskriterierna för ögonen såväl som på positiv och negativ kontrollrespons. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits på en viss dag.
15. Ögonen avlägsnas i laboratoriet, och de orörda kycklinghuvudena ska därför transporteras från slakteriet vid rumstemperatur i plastlådor som fuktas med handdukar indränkta i fysiologisk saltlösning.

Urvalskriterier för ögon som används för ICE-test

16. Ögon med högt grundvärde för fluoresceinfärgning ($> 0,5$) eller korneal opacitet ($> 0,5$) efter tillvaratagandet ska förkastas.
17. Varje behandlingsgrupp med parallell positiv kontroll består av minst tre ögon. Den negativa kontrollgruppen eller lösningsmedelskontrollen (om annat lösningsmedel än saltlösning används) ska bestå av minst ett öga.

FÖRFARANDE

Förberedning av ögonen

18. Ögonlocken skärs bort försiktigt med undvikande av skador på hornhinnan. Hornhinnans intakta skick kan utvärderas snabbt med en droppe 2 % natriumfluorescein (vikt/volym) som appliceras på hornhinnans yta för några sekunder och därefter sköljs bort med fysiologisk saltlösning. De fluoresceinbehandlade ögonen undersöks därefter med spaltlampa för att kontrollera att hornhinnan är intakt (värdet för fluoresceinfärgning och korneal opacitet $\leq 0,5$).
19. Förutsatt att hornhinnan är intakt skärs ögat ut från skallen med varsamhet så att hornhinnan inte skadas. Ögongloben dras ut ur ögonhålan med ett stadigt grepp om blinkhinnan med hjälp av kirurgisk tång och ögonmusklerna klipps av med en böjd trubbig sax. Det är viktigt att greppet om hornhinnan inte är så starkt att det uppstår skador (t.ex. kompressionsartefakter).
20. När ögat har tagits ut ur hålan bör det finnas kvar en vidfäst synlig del av synnerven. Därefter placeras ögat på ett absorberande underlag och blinkhinnan och annan bindvävnad skärs bort.

21. Därefter monteras ögat i en klämma av rostfritt stål med hornhinnan i upprätt riktning. Klämman med ögat överförs till superfusionsapparaten (16). Klämmorna ska placeras i superfusionsapparaten så att droppet med fysiologisk saltlösning når hela hornhinnan. Superfusionsapparatens kammare ska ha en kontrollerad temperatur på $32 \pm 1,5^\circ\text{C}$. I tillägg 3 finns en schematisk bild av en typisk superfusionsapparat med ögonklämmor. Utrustningen kan anskaffas kommersiellt eller konstrueras i laboratoriet. Apparaten kan också anpassas efter behoven vid ett enskilt laboratorium (t.ex. för att hålla ett avvikande antal ögon).
22. Efter att ögonen placerats i superfusionsapparaten granskas de på nytt med spaltlampa för att kontrollera att de inte har fått skador under dissektionen. Samtidigt ska även hornhinnans tjocklek mätas vid hornhinnans apex med hjälp av spaltlampans tillbehör för djupmätning. Ögon som har i) fluoresceinfärgningsvärde $> 0,5$, ii) värde för korneal opacitet $> 0,5$ eller iii) andra tecken på skada ska bytas ut. Ögon som inte har förkastats enligt något av dessa kriterier men där hornhinnans tjocklek avviker mer än 10 % från medelvärdet för alla ögon ska förkastas. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika värden på hornhinnans tjocklek beroende på inställningen för spaltbredd. Spaltbredden ska ställas in på 0,095 mm.
23. Undersökta och godkända ögon inkuberas i cirka 45–60 minuter för att få dem i jämvikt med testsystemet före doseringen. Efter jämviktsperioden görs en referensmätning av hornhinnans tjocklek och opacitet för att få ett grundvärde (tid = 0). Fluoresceinvärdet som uppmättes vid dissektionen används som grundvärde för det resultatmättet.

Applicering av testämnet

24. Omedelbart efter mätningarna av nollreferens tas ögonen (i sina hållare) bort ur superfusionsapparaten, placeras i liggande läge och testämnet appliceras på hornhinnan.
25. Vätskeformiga testämnen används i regel i utspädd form men kan spädas ut om det bedöms vara nödvändigt (t.ex. som en del av försöksutformningen). Eventuell utspädning ska helst göras med fysiologisk saltlösning. Andra lösningsmedel än fysiologisk saltlösning kan användas under kontrollerade förhållanden men då bör lämpligheten påvisas.
26. Vätskeformiga testämnen appliceras på hornhinnan så att hela ytan är jämnt täckt med testämnet (standardvolymen är 0,03 ml).
27. Fasta ämnen ska så långt det är möjligt finfördelas i mortel eller motsvarande redskap. Pulvret appliceras så att hornhinnan blir jämnt täckt med testämnet (standardmängden är 0,03 g).
28. Testämnet (vätska eller fast ämne) får verka på hornhinnan i 10 sekunder och sköljs sedan bort från ögat med rumstempererad fysiologisk saltlösning (cirka 20 ml). Ögat (i sin hållare) återförs därefter till superfusionsapparaten i ursprunglig upprätt position.

Kontrollämnena

29. Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ska ingå i varje försök.
30. Vid testning av utspädda vätskor eller fasta ämnen med ICE-testmetoden ska fysiologisk saltlösning användas som parallell negativ kontroll för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.
31. Vid testning av utspädda vätskor ska en parallell negativ kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel inbegripas för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation. Som det konstateras i punkt 25 får endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet användas.

32. Ett känt ögonirriterande ämne ska ingå som parallell positiv kontroll i varje försök för att bekräfta att rätt slags respons framkallas. Eftersom ICE används i denna testmetod för att identifiera frätande eller kraftigt irriterande ämnen, ska den positiva kontrollen göras med ett referensämne som framkallar kraftig respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer över tiden kan bedömas, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark. Tillräckliga *in vitro*-data bör genereras för den positiva kontrollen så att det går att beräkna ett godtagbart intervall för denna. Om det inte finns tillbörliga historiska ICE-testmetodsdata för en särskild positiv kontroll måste man eventuellt genomföra försök för att få fram denna information.
33. Exempel på positiva kontroller för vätskeformiga testämnen är 10 % ättiksyra eller 5 % bensalkoniumklorid, och exempel på positiva kontroller för fasta testämnen är natriumhydroxid eller imidazol.
34. Referensämnen kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av resultatmått

35. Hornhinnorna utvärderas före behandlingen och vid 30, 75, 120, 180 och 240 minuter (± 5 minuter) efter den sköljning som görs efter behandlingen. Dessa tidpunkter ger ett tillbörligt antal mätningar under den fyra timmar långa behandlingsperioden och ger tillräckligt med tid mellan mätningarna för att genomföra observationerna av alla ögon.
36. De resultatmått som ska bedömas är korneal opacitet, svullnad, fluoresceinfärgning och morfologiska effekter (t.ex. gropbildning eller avlossning av epitel). Alla resultatmått, med undantag av fluoresceinfärgning (som endast bestäms före behandlingen och 30 minuter efter exponering av testämnet) bestäms vid alla de ovan nämnda tidpunkterna.
37. Fotografier rekommenderas för dokumentering av korneal opacitet, fluoresceinfärgning, morfologiska verkningar och, i förekommande fall, histopatologi.
38. Efter den sista granskningen vid tidpunkten fyra timmar är det rekommendabelt att hålla ögonen i lämpligt konserveringsmedel (t.ex. neutralt formalin med buffert) med tanke på eventuell histopatologisk undersökning.
39. Hornhinnans svullnad bestäms genom mätningar av hornhinnans tjocklek med en pachymeter eller spaltlampa. Svullnaden yttrycks som ett procenttal och beräknas på grundval av mätningarna enligt följande formel:

$$\left(\frac{\text{hornhinnans tjocklek vid tidpunkt } t - \text{hornhinnans tjocklek vid tidpunkt } 0}{\text{hornhinnans tjocklek vid tidpunkt } = 0} \right) \times 100$$

40. Medelvärde för hornhinnans svullnad för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för svullnad oavsett observationstidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testämnet.
41. Den korneala opaciteten beräknas på grundval av mätningarna på det område av hornhinnan som har den tätaste opaciteten. Medelvärde för den korneala opaciteten för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för korneal opacitet oberoende av tidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testämnet (tabell 1).

Tabell 1

Värden för korneal opacitet

Värde	Observation
0	Ingen opacitet
0,5	Mycket svag opacitet

Värde	Observation
1	Spridda eller diffusa områden med opacitet, alla detaljer i iris är klart synliga
2	Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade
3	Kraftig opacitet, inga detaljer i iris är synliga, pupillens storlek kan knappt urskiljas
4	Fullständig korneal opacitet, iris syns inte

42. Medelvärdet för fluoresceinfärgning för alla testögon beräknas endast för observationstidpunkten 30 minuter och används för övergripande kategorivärde som ges för varje testämne (tabell 2).

Tabell 2

Värden för fluoresceinfärgning

Värde	Observation
0	Ingen fluoresceinfärgning
0,5	Mycket svag färgning av enskilda celler
1	Färgning av enskilda celler spridda över hornhinnans behandlade yta
2	Fokal eller konfluerande tät färgning av enskilda celler
3	Konfluenta stora områden av hornhinnan har färgats av fluorescein

43. Till de morfologiska effekterna hör gropbildning i hornhinnans epitel, avlossning av epitel, uppruggning av hornhinnans yta och vidfästning av testämnet vid hornhinnan. Dessa observationer kan ha olika allvarlighetsgrad och kan förekomma samtidigt. Klassificeringen av observationerna är subjektiva och beror på personlig tolkning.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

44. Resultaten för korneal opacitet, svullnad och fluoresceinfärgning bör utvärderas separat för att ge en ICE-klass för varje resultatmått. ICE-klasserna för varje resultatmått kombineras därefter, så att man får en klassificering av varje testämne med avseende på irritationsframkallande egenskaper.

Beslutskriterier

45. Efter att varje resultatmått har utvärderats kan ICE-klasser tilldelas i enlighet med en på förhand fastställd skala. Tolkningen av hornhinnans tjocklek (tabell 3), opacitet (tabell 4) och fluoresceinfärgning (tabell 5) med användning av fyra ICE-klasser görs enligt följande:

Tabell 3

ICE-klassificeringskriterier för hornhinnans tjocklek

Medelvärde för svullnad (%) (*)	ICE-klass
0 till 5	I
> 5 till 12	II
> 12 till 18 (> 75 min. efter behandling)	II
> 12 till 18 (≤ 75 min. efter behandling)	III
> 18 till 26	III

Medelvärde för svullnad (%) (*)	ICE-klass
> 26 till 32 (> 75 min. efter behandling)	III
> 26 till 32 (≤ 75 min. efter behandling)	IV
> 32	IV

(*) Värdena för svullnad kan bara tillämpas när tjockleken mäts med Haag-Streit BP900 spaltlampa med tillbehör nr I för mätning av djup och spaltbreddsinställningen 9½, som motsvarar 0,095 mm. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika resultat för hornhinnans tjocklek beroende på vilken spaltbredd som används.

Tabell 4

ICE-klassificeringskriterier för opacitet

Medelvärde för största opacitet (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Se tabell 1.

Tabell 5

ICE-klassificeringskriterier för fluoresceinfärgning

Medelvärde för fluoresceinfärgning 30 minuter efter behandlingen (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Se tabell 2.

46. Testämnets övergripande klassificering för irritation *in vitro* bedöms genom avläsning av den klassificering för irritation som motsvarar kombinationen av kategorier för hornhinnan i fråga om svullnad, korneal opacitet och fluoresceinfärgning, och genom tillämpning av schemat i tabell 6.

Tabell 6

Övergripande klassificeringar för irritation *in vitro*

Klassificering	Kombination av de tre resultatmått
Frätande/Kraftigt irriterande	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × III (*) 2 × IV, 1 × I (*) Korneal opacitet ≥ 3 vid 30 min. (minst två ögon) Korneal opacitet = 4 oavsett tidpunkt (minst två ögon) Kraftig avlossning av epitel (minst ett öga)

(*) Kombinationer som är mindre sannolika.

47. Som det konstateras i punkt 1 i fråga om testämnen som inte identifieras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen, bör ytterligare testning genomföras för klassificerings- och märkningsändamål. ICE-testmetoden har en övergripande exakthet på 83 % (120/144) till 87 % (134/154), falska positiva värden på 6 % (7/122) till 8 % (9/116) och falska negativa värden på 41 % (13/32) till 50 % (15/30) för identifiering av ämnen som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen, jämfört med *in vivo*-testning på kaninögon enligt klassifikationssystemen EPA (1), EU (2) eller GHS (3). När ämnen inom en viss kemikalieklass (t.ex. alkoholer och ytaktiva ämnen) eller fysikalisk klass (t.ex. fasta ämnen) utesluts ur databasen, sträcker sig exaktheten hos ICE inom klassifikationssystemen EU, EPA, och GHS från 91 % (75/82) till 92 % (69/75), falska positiva värden från 5 % (4/73) till 6 % (4/70) och falska negativa värden från 29 % (2/7) till 33 % (3/9) (4).
48. Även om ett testämne inte klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen kan data från ICE vara användbara i kombination med testdata från *in vivo*-test på kaninögon eller *in vitro*-test, för vidare utvärdering av användbarheten och begränsningarna för ICE-testmetoden när det gäller att identifiera ämnen som inte framkallar kraftig irritation eller som inte alls framkallar irritation (en vägledning om användning av *in vitro*-test för ögontoxicitet håller på att utarbetas).

Kriterier för godkännande av ett försök

49. Ett försök anses vara godtagbart om de parallella negativa kontrollerna eller vehikel-/lösningsmedelkontrollerna och de parallella positiva kontrollerna ger irritationsklassificeringar som faller inom klasserna icke-irriterande respektive kraftigt irriterande/frätande.

Testrapport

50. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Test- och kontrollämnena

Kemiskt namn (kemiska namn) såsom det strukturella namn som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända namn.

CAS-registernummer (RN), om det är känt.

Ämnets eller blandningens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.

Behandling av test- och kontrollämnena före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Angivelse av ögonkällan (anläggning där ögonen togs till vara).

Förvarings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tid för tillvaratagande, tidsintervall före försöksstart).

Om möjligt specifika egenskaper för de djur från vilka ögonen togs till vara (t.ex. ålder, kön, vikt).

Motivering för den testmetod och det protokoll som använts

Testmetodens integritet

Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. exakthet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning med kvalifikationsämnen, användning av historiska data från negativa och positiva kontroller).

Kriterier för godtagbart försök

Om tillämpligt, godtagbara intervaller för parallella referenskontroller på grundval av historiska data.

Försöksförhållanden

Beskrivning av testsystemet.

Spaltlampa som använts (t.ex. modell).

Spaltlampans inställningar.

Uppgifter om de kycklingögon som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet.

Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

Testämneskoncentration(er).

Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Hänvisningar till modellens historiska data (t.ex. negativa och positiva kontroller, kvalifikationsämnen, referensämnen).

Beskrivning av utvärderingskriterierna.

Resultat

Beskrivning av övriga observerade effekter.

Fotografier av ögat, om det är lämpligt.

*Diskussion av resultaten**Slutsatser***LITTERATUR**

- (1) U.S. EPA (1996), Label Review Manual, andra utgåvan, EPA737-B-96-001, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006, EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (3) Förenta nationerna (FN) (2007), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade upplagan, FN New York och Genève, 2007, finns på

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

- (4) ICCVAM (2007), Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

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

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

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

- (6) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002), Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion, finns på
- [http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
- (8) ICCVAM (2007), ICCVAM:s rekommenderade testprotokoll för ICE-testmetoden, ingår i "ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives", Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på
- http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm
- (9) ICCVAM (2006), Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method, NIH:s publikation nr: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program, finns på
- http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm
- (10) M. K. Prinsen och B. W. M. Koëter, (1993), "Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits", *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) INVITTOX (1994), Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET), finns på
- <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- (12) M. Balls, P. A Botham, L. H. Bruner och H. Spielmann, (1995), "The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test", *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- (13) M. K. Prinsen, (1996), "The chicken enucleated eye test (CEET), A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials", *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
- (14) M. Chamberlain, S. C. Gad, P. Gautheron och M. K. Prinsen, (1997), "IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation", *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) J. D. Siegel, E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello och Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, finns på
- <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
- (16) J. K. Maurer, R. D. Parker och J. V. Jester (2002), "Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays", *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (17) A. B. G. Burton, M. York och R. S. Lawrence (1981), "The *in vitro* assessment of severe irritants", *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471-480.
- (18) ICCVAM (2006), Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method, finns på
- [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, finns på
- http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med "konkordans" för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod.

Referensämne: ett ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikaliska/kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

Korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för ett testämne. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan.

Svullnad av hornhinnan: en objektiv mätning vid ICE-försök av hur mycket hornhinnan sväller efter exponering för ett testämne. Den uttrycks som ett procenttal och beräknas utifrån ett grundvärde som fås vid mätning av hornhinnans tjocklek före exponering och den tjocklek som uppmäts med regelbundna intervaller efter exponering för testämnet. Graden av svullnad är en indikation på skadan på hornhinnan.

EPA-kategori 1: frätande (irreversibel skada på okulär vävnad) eller kornealpåverkan eller irritation som varar mer än 21 dagar (1).

EU-kategori R41: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativa. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fluoresceinfärgning: en subjektiv mätning vid ICE-försök av den mängd natriumfluorescein som hornhinnans epitelceller håller kvar efter exponering för ett testämne. Mängden fluorescein som hålls kvar är en indikation på skada på hornhinnan.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnens skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (3).

GHS-kategori 1: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (3).

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testämnesbehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Icke-irriterande: ett ämne som inte klassificeras som ögonirriterande ämnen enligt EPA-kategori I, II, eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B (1) (2) (3).

Frätande för ögonen: a) ett ämne som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) ett ämne som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

Irriterande för ögonen: a) ett ämne som orsakar en reversibel ändring på ögat efter applicering på ögats främre yta, b) ett ämne som klassificeras som irriterande för ögonen enligt EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

Kraftigt irriterande för ögonen: a) ett ämne som efter applicering på ögats främre yta orsakar vävnadsskada på ögat som inte är reversibel inom 21 dagar efter appliceringen eller som orsakar kraftig synnedsättning, b) ett ämne som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Spaltlampa: ett instrument som används för direkt undersökning av ögat under förstoring genom ett binokulärt mikroskop och som visar en stereoskopisk, topografisk bild. Vid ICE-försök används instrumentet för att granska kyckling-ögats främre struktur och för objektiv mätning av hornhinnans tjocklek med tillbehöret för mätning av djup.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testämnesbehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testämnet upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Stegvis testning: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om ett testämne granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (*weight of evidence*) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testämnets förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testämnets förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål

Sammanvägd bedömning: (*weight of evidence*) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande ett ämnas faropotential.

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR ICE-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av en testmetod enligt denna testvägledning kan laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av frätande verkan på ögonen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för lokal ögonirritation/frätande verkan enligt resultaten från *in vivo*-test på kaninögon (TG 405) (dvs. kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering och märkning enligt FN GHS (3) (7). Med beaktande av det validerade ändamålet för dessa testningar (endast för identifiering av ämnen som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen) finns det dock bara två testutslag för klassificeringsändamål (frätande/kraftigt irriterande eller icke-frätande/icke kraftigt irriterande för ögonen) när det gäller att demonstrera kvalitet. Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till *in vivo*-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från de två *in vitro*-metoder för vilka testriktlinjer håller på att utarbetas. Därför valdes irriterande ämnen från ICCVAM:s förteckning med 122 rekommenderade referensämnen för validering av *in vitro*-testmetoder för okulär toxicitet (se tillägg H till ICCVAM:s förteckning med rekommenderade referensämnen (4). Referensdata finns i ICCVAM Background Review Documents för testmetoderna BCOP och ICE (18) (19).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet med ICE-testmetoden

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ⁽¹⁾	Fysikalisk form	<i>In vivo</i> -klassificering ⁽²⁾	<i>In vitro</i> -klassificering ⁽³⁾
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
2,6-Diklorbensoylklorid	4659-45-4	Acyhalid	Vätska	Kategori 2A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2B	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen märkning	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
n-hexan	110-54-3	Kolväte (acykliskt)	Vätska	Ingen märkning	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

⁽¹⁾ De kemiska klasserna tilldelades vart och ett testämne med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ På grundval av *in vivo*-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av FN GHS (3) (7).

⁽³⁾ På grundval av resultat i BCOP och ICE.

Tillägg 3

Superfusionsapparat och ögonklämmor för ICE-testmetoden

(Se Burton m.fl. (17) för ytterligare allmänna beskrivningar av superfusionsapparat och ögonklämma)

