

РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 1152/2010 НА КОМИСИЯТА

от 8 декември 2010 година

за изменение, с цел адаптиране към научно-техническия прогрес, на Регламент (ЕО) № 440/2008 за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета за регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕИО на Съвета и директиви 91/155/ЕИО, 93/67/ЕИО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията⁽¹⁾, и по-специално на член 13, параграф 3 от него,

като има предвид, че:

- (1) Регламент (ЕО) № 440/2008 на Комисията⁽²⁾ съдържа методите за изпитване за целите на определянето на физикохимичните свойства, токсичността и екоотоксичността на вещества, които методи да бъдат използвани за целите на Регламент (ЕО) № 1907/2006.
- (2) Необходимо е да се актуализира Регламент (ЕО) № 440/2008, като бъдат включени приоритетно два нови метода *in vitro* за изпитване за дразнещо действие върху очите, приети наскоро от Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (ОИСР), с цел да се постигне

намаление на броя на животните, използвани с експериментална цел, съобразно с Директива 86/609/ЕО на Съвета от 24 ноември 1986 г. за сближаване на законите, подзаконовите и административни разпоредби на държавите-членки по отношение на защитата на животни, които са използвани за експериментални и други научни цели⁽³⁾. Проведени са консултации със заинтересовани страни по настоящия проектодокумент.

- (3) Следователно Регламент (ЕО) № 440/2008 следва да бъде съответно изменен.
- (4) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Комитета, създаден съгласно член 133 на Регламент (ЕО) № 1907/2006,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

В Част Б на Приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 се добавят глави Б.47 и Б.48, формулирани в приложението към настоящия регламент.

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след деня на публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

Съставено в Брюксел на 8 декември 2010 година.

За Комисията
Председател
José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1.

⁽²⁾ ОВ L 142, 31.5.2008 г., стр. 1.

⁽³⁾ ОВ L 358, 18.12.1986 г., стр. 1.

ПРИЛОЖЕНИЕ

„Б. 47 МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА НЕПРОЗРАЧНОСТ И ПРОПУСКЛИВОСТ НА ГОВЕЖДАТА РОГОВИЦА ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ВЕЩЕСТВА С КОРОЗИВНО И ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Методът за изпитване на непрозрачност и пропускливост на говеждата роговица (НПГР) е метод *in vitro*, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения за класифициране на „вещества и смеси с корозивно или дразнещо действие върху очите“ (1) (2) (3). За целите на настоящия метод за изпитване като вещества с дразнещо действие се дефинират такива, които предизвикват лезии върху очите на заек и траят най-малко 21 дни след прилагането. Въпреки че не се смята за валиден като пълен заместител на *in vivo* теста върху заешки очи, методът НПГР се препоръчва да се използва като част от една поетапна стратегия за регулаторно класифициране и етикетиране в обхвата на конкретна област на приложимост (4) (5). Изпитваните вещества и смеси (6) могат да се класифицират като корозивни или дразнещи за очите без по-нататъшно изпитване върху зайци. Вещества, които показват отрицателен резултат, е необходимо да се изпитват върху зайци, като се прилага стратегия за последователно изпитване както това е разгледано в Ръководството за изпитания на ОИСП 405 (7) (глава Б.5 в настоящото приложение).
2. Целта на този метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалното корозивно или дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество, измерени чрез способността му да индуцира непрозрачност и повишена пропускливост върху изолирана говежда роговица. Токсичният ефект върху роговицата се измерва чрез: (i) намаленото преминаване на светлина (непрозрачност), и (ii) повишено пропускане на натриев флуоресцентен оцветител (пропускливост). Оценките за непрозрачността и пропускливостта на роговицата след прилагане на изпитваното вещество се комбинират, за да се получи *In Vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИВБОДЦ), която се използва за класифициране според степента на дразнещо действие на изпитваното вещество.
3. С метода на изпитване НПГР са извършвани тестове на вещества с дразнещо действие върху очите, предизвикващи лезии, които преминават за по-малко от 21 дни и на вещества без дразнещо действие. Въпреки това не е направена официална оценка за точността и надеждността на метода за изпитване НПГР за тези категории вещества.
4. Определенията са дадени в Допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Този метод за изпитване се базира на протокола за метода за изпитване НПГР (8) на Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM), който бе изготвен след едно международно изследване за валидиране (4)(5)(9), за което принос имаха Европейският център за валидиране на алтернативни методи (ECVAM) и Японският център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM). Протоколът се базира на информация, получена от Института за *in vitro* науки (IVS) и протокол 124 на INVITTOX (10), който е протоколът, използван за изследване за предварително валидиране на анализи с НПГР, проведено в периода 1997-1998 г. и спонсорирано от Европейската общност. Тези два протокола се базират на методиката за анализ на НПГР, която за първи път се споменава от Gautheron *et al.* (11).
6. Установените ограничения на този метод за изпитване се базират на високите равнища на неверните положителни резултати за алкохоли и кетони и високите равнища на неверните отрицателни резултати за твърди вещества, отчетени в базата данни за валидиране (вж. точка 44) (5). Когато веществата от тези химични и физични класове бъдат изключени от базата данни, точността на НПГР навсякъде в системите за класификация на ЕС, ЕРА и Глобалната система за хармонизиране на класификацията на химични вещества и смеси GHS значително се подобрява (5). Според целта на този анализ (т.е. да се определят само веществата с корозивно/дразнещо действие върху очите) неверните отрицателни резултати не са от критично значение, тъй като такива вещества се тестват впоследствие при зайци или чрез други съответно валидирани *in vitro* изпитания в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, отчитащ значимостта на различните видове данни. Освен това текущата база данни за валидирането не позволяваше да бъде направена адекватна оценка на някои класове химикали или продукти (напр. смеси). Въпреки това изследователите биха могли да използват този метод за всякакви видове изследван материал (включително за смеси), като положителният резултат може да се приеме за показател за корозивно или дразнещо действие върху очите. Все пак положителни резултати, получени от алкохоли или кетони следва да се тълкуват предпазливо, поради опасността от свръхпрогнозиране на опасност.
7. Всички процедури с говежди очи и говежда роговица следва да съответстват на приложимите за изпитвателната лаборатория разпоредби и процедури за работа с материали с животински произход, които включват, но не се ограничават само с тъкани и тъканна течност. Препоръчва се спазването на универсалните лабораторни предпазни мерки (12).
8. Едно ограничение на метода за изпитване е фактът, че въпреки че той отчита някои от действията върху очите, изследвани с метода за изследване на дразнещо действие върху заешки очи, и до известна степен отчита и силата на това действие, той не взема под внимание уврежданията на конюнктивата и ириса. Също така, въпреки че с анализа на НПГР не може да се направи оценка *per se* на обратимостта на лезиите върху роговицата, бе предложено въз основа на изследванията върху заешки очи оценката за първоначалната дълбочина на увреждането на роговицата да се използва за разграничаването на необратимото от обратимото действие (13). В заключение, НПГР не позволява да се направи оценка на потенциала за системно токсично действие, свързано с експонирането на очите.

9. Продължават усилията да се охарактеризират допълнително ползата и ограниченията на анализа за НППР за определянето на вещества със слабо или без дразнещо действие (вж. също точка 45). Приканват се потребителите да предоставят на валидиращите организации проби и/или данни за официално оценяване на възможните бъдещи приложения на метода за изпитване НППР, включително и за определяне на вещества със слабо или без дразнещо действие.
10. Всяка лаборатория, която за първи път започва да извършва такива анализи, следва да използва опитните химикали, посочени в Допълнение 2. Лабораториите могат да използват тези химикали за доказване на своята техническа компетентност за прилагане на метода за изпитване НППР преди предаване на данните от анализа за НППР за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

11. Методът за изпитване НППР е органотипен модел, който осигурява краткотрайно поддържане на нормалната физиологична и биохимична функция на говеждата роговица *in vitro*. При този метод за изпитване увреждането, причинено от изпитваното вещество, се оценява посредством количествени измервания на измененията в непрозрачността и пропускливостта на роговицата, извършвани съответно с уред за измерване на непрозрачността и спектрофотометър за видимата светлина. Двете измервания се използват за изчисляване на *In Vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИББОДЦ), която се използва за *in vitro* категоризиране според класификацията по степен на опасност от дразнещо действие за прогнозиране на *in vivo* потенциала за дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество (вж. критериите за решението).
12. За метода за изпитване НППР се използва изолирана роговица от очите на прясно заклан едър рогат добитък. Непрозрачността на роговицата се измерва количествено чрез количеството на светлопреминаването през роговицата. Пропускливостта се измерва количествено като количеството натриев флуоресцентен оцветител, което преминава през цялата дебелина на роговицата, отчетено в средата в задното отделение. Изпитваното вещество се нанася върху епителиалната повърхност на роговицата чрез добавяне в предното отделение на държателя за роговицата. В Допълнение 3 са дадени описание и схема на държател за роговицата, използван за анализа за НППР. Държатели за роговица могат да се набавят от различни източници на пазара или да се изработят.

Източник и възраст на говеждите очи и избор на животински вид

13. Едрият рогат добитък, който се изпраща за клане, обикновено се използва за консумация от човека или за други търговски цели. Като източник на роговица за целите на метода за изпитване НППР се използват само здрави животни, смятани за подходящи за включване в хранителната верига на човека. Тъй като едрият рогат добитък може да бъде с различно тегло според породата, възрастта и пола, няма изискване за препоръчително тегло на животните при клане.
14. Когато се използват очи от различни по възраст животни могат да се получат разлики в размерите на роговицата. Роговицата на едър рогат добитък на възраст над осем години обикновено е с хоризонтален диаметър $> 30,5$ mm и дебелина в средата на роговицата (ССТ) $\geq 1\ 100$ μ m, докато роговица с хоризонтален диаметър $< 28,5$ mm и дебелина в средата на роговицата ССТ < 900 μ m обикновено се получава от едър рогат добитък на възраст под пет години (14). Поради това обикновено не се използват очи от едър рогат добитък на възраст над 60 месеца. Обичайно е да не се използват очи от едър рогат добитък на възраст под 12 месеца, тъй като тогава те все още са в развитие и дебелината и диаметърът на роговицата са значително по-малки от отчетените за очи на възрастен добитък. Все пак се допуска да се използва роговица от млади животни (напр. на възраст от 6 до 12 месеца), тъй като това дава някои предимства, като по-лесното набавяне, по-малкия възрастов диапазон и намалената опасност, свързана с потенциалната възможност работещите да бъдат заразени със спонгиформна енцефалопатия по едрия рогат добитък (15). Тъй като ще бъде от полза да продължи оценката на ефекта от размерите или дебелината на роговицата върху реакцията срещу вещества с корозивно и дразнещо действие, потребителите се приканват да доклават за предполагаемата възраст и/или тегло на животните, от които се доставя използваната в изследването роговица.

Събиране и транспортиране на очите до лабораторията

15. Очите се събират от работещите в кланицата. За да се сведат до минимум механичните и други видове увреждания на очите, те следва да се извадят възможно най-скоро след настъпване на смъртта. За да се избегне излагането на очите на въздействието на вещества с потенциално дразнещо действие, работещите в кланицата не трябва да използват почистващи препарати при миенето на главите на животните.
16. Очите следва да бъдат изцяло потопени в балансиран солен разтвор на Ханкс (HBSS) в съд с подходящи размери и транспортирани до лабораторията по начин, който позволява да бъдат сведени до минимум развалянето и/или бактериалното замърсяване. Тъй като очите се вземат по време на кланичния процес, те може да са покрити с кръв и други биологични вещества, включително бактерии и други микроорганизми. Поради това е важно да се осигури свеждане до минимум на риска от замърсяване (напр. като съдът с очите се постави върху мокър лед, като към балансирания солен разтвор на Ханкс, в който се съхраняват очите по време на транспорта, се добавят антибиотици (напр. 100 IU/mL пеницилин и 100 mg/mL стрептомицин)).
17. Интервалът от време между вземането на очите и използването на роговицата за метода НППР следва да бъде сведен до минимум (обикновено вземането и използването става в рамките на един и същ ден) и следва убедително да се покаже, че не компрометира резултатите от анализа. Тези резултати се базират на критериите за подбор на очите, както и на реакцията на положителната и отрицателната контрола. Всички очи, използвани за анализа, следва да бъдат от една и съща група очи, взета през даден ден.

Критерии за избор на очи, използвани за метода НППР

18. След пристигане в лабораторията очите се оглеждат внимателно за дефекти, включително за повишена непрозрачност, драскотини и неоваскуларизация. Използват се само роговици от очи без такива дефекти.
19. Качеството на всяка роговица се оценява също и на по-късните етапи в анализа. Роговици с непрозрачност по-голяма от седем единици (забележка: уредът за измерване на непрозрачност следва да бъде калибриран с еталони за непрозрачност, използвани за установяване на единиците непрозрачност, вж. Допълнение 3), след първия един час време за уравнивяване се изхвърлят.
20. Всяка третирана група (изпитвано вещество, съответни отрицателна и положителна контроли) се състои от минимум три очи. За отрицателната контрола в анализа за НППР се използват три роговици. Тъй като всички роговици са изрязани от цялата очна ябълка и поставени в отделенията за роговица, съществува вероятност стойностите за непрозрачност и пропускливост за отделните роговици (включително отрицателната контрола) да бъдат повлияни в резултат на човешката намеса при манипулациите. Освен това стойностите за непрозрачност и пропускливост от отрицателната контрола се използват за коригиране на стойностите за непрозрачност и пропускливост на роговицата от изпитваната проба и от положителната контрола – третираната роговица при изчисляването на *In Vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИБВОЦД).

ПРОЦЕДУРА**Подготовка на очите**

21. Върху свободна от дефекти роговица се прави разрез, така че от склерата да остане пръстен от 2 до 3 мм за улесняване на последващите манипулации, като се внимава да се избягва увреждане на епителния и ендотелния на роговицата. Изолираните роговици се поставят в специално изработени държатели, които имат предно и задно отделение, които са съответно откъм епителиалната и ендотелиалната страна на роговицата. Двете отделения са пълни до преливане с предварително затоплена среда EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (първо задното отделение), като се внимава да няма мехури. След това уредът се уравнивява при 32 ± 1 °C в продължение на най-малко един час, за да може роговицата да се уравни с средата и да се достигне до нормална метаболитна дейност в степента, в която това е възможно (приблизителната температура на повърхността на роговицата *in vivo* е 32 °C).
22. След периода на уравнивяване в двете отделения се добавя прясна предварително затоплена среда EMEM и се отчитат базовите стойности за непрозрачност за всяка роговица. Роговици с макроскопични тъканни увреждания (напр. драскотини, пигментация, неоваскуларизация) или непрозрачност > 7 единици се изхвърлят. Изчислява се средната непрозрачност за всички уравниесени роговици. Най-малко три роговици със стойности за непрозрачност близки до средната за всички роговици се избират за отрицателна контрола (или контрола само с разтворител). Останалите роговици се разпределят на групи за опитно третиране и за положителна контрола.
23. Тъй като топлинният капацитет на водата е по-висок от този на въздуха, водата осигурява по-стабилни температурни условия за инкубация. Поради това, препоръчва се да се използва водна баня за поддържане на температура от 32 ± 1 °C на държателя и неговото съдържание. От друга страна, могат да се използват и въздушни инкубатори, като се вземат необходимите мерки температурата да се поддържа постоянна (напр. като се затоплят предварително държателят и средата).

Прилагане на изпитваното вещество

24. Използват се два различни протокола за третиране – един за течности и повърхностно активни вещества (твърди или течни) и един за повърхностно неактивни твърди вещества.
25. Течностите се изпитват неразредени, докато повърхностно активните вещества се изпитват при концентрации от 10 % w/v в 0,9 % разтвор на натриев хлорид, дестилирана вода или друг разтворител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестовата система. Полутвърди вещества, кремообразни вещества и парафините обикновено се изпитват във вид на течности. За използване на други концентрации при разреждане следва да се направи подходяща аргументация. Роговицата се експонира на течностите или повърхностно активните вещества в продължение на 10 минути. Използването на друга продължителност на експозицията следва да бъде придружено от подходяща научна обосновка.
26. Повърхностно неактивните твърди вещества обикновено се изпитват във вид на разтвори или суспензии при 20 % концентрация в 0,9 % разтвор на натриев хлорид, дестилирана вода или друг разтворител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестовата система. При някои обстоятелства и подходящо научно обосноваване твърдите вещества могат да се изпитват и в чист вид чрез пряко прилагане върху повърхността на роговицата, като се използва методът с отворено отделение (вж. точка 29). Роговицата се експонира на твърдите вещества в продължение на четири часа, но както и при течностите и повърхностно активните вещества, при подходяща научна обосновка може да се приложи и друга продължителност на експозицията.
27. В зависимост от физичната природа и химичните характеристики на изпитваното вещество (напр. твърди вещества, течности, вискозни или невискозни течности) могат да се използват различни методи на третиране. Критичният фактор е да се осигури изпитваното вещество да покрива добре епителиалната повърхност и да бъде подходящо отстранено при етапите на измиване. Когато изпитваните вещества са невискозни или слабо вискозни течности, обикновено се използва методът със затворено отделение, а когато изпитваните вещества са полувискозни и вискозни течности и твърди вещества в чист вид — обикновено се използва методът с отворено отделение.

28. При метода със затворено отделение през отворите за дозиране върху горната повърхност в предното отделение се въвежда достатъчно количество от изпитваното вещество (750 μL), така че да покрие епителиалната страна на роговицата, след което по време на експозицията отворите се затварят със запушалките на отделението. Важно е да се осигури всяка роговица да се експонира на изпитваното вещество в продължение на съответния период от време.
29. При метода с отворено отделение пръстенът за затваряне на прозореца и стъкленият прозорец се отстраняват от предното отделение преди третирането. Контролното или изпитваното вещество (750 μL или такова количество от изпитваното вещество, което е достатъчно за да покрие напълно роговицата) се прилагат непосредствено върху епителиалната повърхност на роговицата, като се използва микропипета. Ако е трудно изпитваното вещество да се вземе с пипета, то може да се зареди под налягане в нагнетателна пипета за улесняване на дозирането. Краят на нагнетателната пипета се поставя в отворения край на спринцовката, за да може материалът да бъде зареден в нагнетателния край под налягане. Едновременно с това буталото на спринцовката се натиска докато буталото на пипетата се изтегля нагоре. Ако на върха на пипетата се появят мехурчета въздух, изпитваният материал се изважда (отстранява) и процесът се повтаря, докато краят се запълни без въздушни мехури. Ако е необходимо, може да се използва нормална спринцовка (без игла), тъй като тя позволява да се измери точно обемът на изпитваното вещество и по-лесното му нанасяне по епителиалната повърхност на роговицата. След дозирането стъкленият прозорец се поставя отново на предното отделение, за да се затвори системата.

Инкубация след експозиция

30. След изтичане на времето за експозиция, изпитваното вещество, отрицателното контролно вещество или положителното контролно вещество се отстраняват от предното отделение и епителият се измива със средата EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (съдържаща червен фенол) най-малко три пъти (или докато не останат видими следи от изпитваното вещество). Средата със съдържание на червен фенол се използва за измиване, защото може да се наблюдава промяната на цвета на червения фенол, за да се определи ефективността на измиващите алкални или киселинни материали. Роговиците се измиват повече от три пъти ако червеният фенол продължава да променя цвета си (до жълто или лилаво) или ако още има видими следи от изпитваното вещество. След като средата бъде изчистена от изпитваното вещество, роговиците се измиват за последен път със средата EMEM (без червен фенол). EMEM (без червен фенол) се използва за последното измиване, за да се осигури отстраняването на червения фенол от предното отделение преди да се направи измерването за непрозрачност. След това предното отделение се пълни отново с прясна среда EMEM без червен фенол.
31. При течности или повърхностно активни вещества след измиването роговиците се подлагат на инкубация за още два часа при 32 ± 1 °C. В някои случаи може да е полезно да се удължи следекспозиционното време и решението за това може да се вземе според индивидуалния случай. Роговици, третирани с твърди вещества се измиват старателно в края на четиричасовата експозиция, но не изискват допълнителна инкубация.
32. В края на периода на следекспозиционна инкубация за течности и повърхностно активни вещества и в края на четиричасовата експозиция за повърхностно неактивни твърди вещества се отчитат непрозрачността и пропускливостта на всяка роговица. Също така се прави визуален оглед на всяка роговица и се записват съответните наблюдения (напр. обелване на тъканта, остатъци от изпитваното вещество, неравномерна непрозрачност). Тези наблюдения могат да бъдат важни, тъй като могат да се отразят като колебания в отчетените стойности от уреда за измерване на непрозрачност.

Контроли

33. Във всеки експеримент се включват паралелни отрицателни или контроли „разтворител/носител“ и положителни контроли.
34. Когато се изпитва течно вещество със 100 % концентрация, в метода за изпитване НППР се включва паралелна отрицателна контрола (напр. 0,9 % разтвор на натриев хлорид или дестилирана вода), за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за осигуряване на базова линия за крайните резултати от анализа. Също така, тя осигурява проверка, че не се причинява дразнителна реакция от неподходящи условия при провежданият опит.
35. Когато се изпитва разрежена течност, повърхностно активно вещество или твърдо вещество, в метода за изпитване НППР се включва паралелна контролна група „разтворител/носител“ за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за осигуряване на базова линия за крайните резултати от анализа. Може да се използва само разтворител/носител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестовата система.
36. Във всеки експеримент се включва известно вещество с дразнещо действие върху очите като паралелна положителна контрола за удостоверяване на индуцирането на съответната реакция. Тъй като при този метод за изпитване анализът на НППР се използва за определяне на вещества с корозивно или силно дразнещо действие, най-добре би било положителната контрола да е еталонно вещество, което при този метод за изпитване индуцира остра реакция. Все пак, за да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на реакцията срещу веществото с дразнещо действие не следва да е прекомерно голяма.
37. Примери за положителни контроли за течни изпитвани вещества са диметилформамид или 1 % натриева основа. Пример за положителна контрола за твърди изпитвани вещества е 20 % (w/v) имидазол в 0,9 % разтвор на натриев хлорид.

38. Сравнителните контролни вещества са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен химичен или продуктово клас, или за оценка на съответния потенциал за дразнещо действие на вещества с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен диапазон от реакции на дразнене.

Измерени крайни резултати

39. Непрозрачността се определя от количеството на светлопреминаването през роговицата. Непрозрачността на роговицата се измерва количествено с помощта на уред за измерване на непрозрачност, при което се получават стойности за непрозрачността, измерени по непрекъснатата скала.
40. Пропускливостта се определя от количеството натриев флуоресцеинов оцветител, което прониква през всички клетъчни слоеве на роговицата (т.е. от епителния по външната повърхност на роговицата до ендотелния по вътрешната повърхност на роговицата). 1 mL натриев флуоресцентен оцветител (4 или 5 mg/mL когато се изпитват съответно течности и повърхностно активни твърди вещества или повърхностно неактивни твърди вещества) се поставя в предното отделение на държателя за роговицата, в което се помества епителната страна на роговицата, докато задното отделение, в което се помества ендотелната страна на роговицата, е пълно с прясна среда EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium). След това държателят се инкубира в хоризонтално положение в продължение на 90 ± 5 минути при 32 ± 1 °C. Количеството натриев флуоресцеин, което преминава в задното отделение, се измерва количествено с помощта на UV/VIS спектрофотометър. Спектрофотометричните измервания, съответстващи на 490 nm, се отчитат като стойности за оптичната плътност (OD_{490}) или за абсорбцията, които се измерват по непрекъснатата скала. Стойностите за пропускливостта на флуоресцеина се определят като се използват стойностите OD_{490} на базата на спектрофотометър за видимата светлина, използващ стандартен ход на светлината от 1 cm.
41. Друга възможност е да се използва четец на 96-гнездна микротитърна плоча, при условие че: (i) може да се определи линейният диапазон на четеща с плочата за определяне на OD_{490} стойностите за флуоресцеина; и (ii), в 96-гнездната плоча се постави точният обем проби с флуоресцеин, за да се получат стойности OD_{490} , еквивалентни на еталонната дължина на хода на светлината от 1 cm (това може да изисква гнездата да са пълни докрай [обикновено 360mL]).

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Оценка на данните

42. След като стойностите за непрозрачност и средна пропускливост (OD_{490}) бъдат коригирани спрямо фоновата непрозрачност и стойностите за пропускливост OD_{490} на отрицателната контрола, средните стойности за непрозрачност и пропускливост OD_{490} за всяка третирана група се свързват в една емпирично получена формула за изчисляване на *In Vitro* баловата оценка за дразнещото действие (ИВБОДЦ) за всяка третирана група както следва:

$$\text{ИВБОДЦ} = \text{средната стойност на непрозрачност} + (15 \times \text{средната стойност на пропускливост } OD_{490})$$

Sina *et al.* (16) са докладвали, че тази формула е изведена по време на вътрешни и междулабораторни изследвания. Получените данни в едно многолабораторно изследване за поредица от 36 съединения са били подложени на мултивариантен анализ за определяне на уравнението, което най-добре се вписва между *in vivo* и *in vitro* данните. Този анализ е извършен от учени в две различни компании, които извеждат почти еднакви формули.

43. Стойностите за непрозрачност и пропускливост следва да се оценяват и независимо, за да се определи дали дадено изпитвано вещество индуцира корозивност или силно дразнене само чрез един от двата крайни резултата (вж. критериите за решението).

Критерии за формулирането на решение

44. Вещество, което индуцира ИВБОДЦ $\geq 55,1$ се определя като вещество с корозивно или силно дразнещо действие. Както бе споменато в точка 1, когато изпитваното вещество не се определи като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, следва да бъдат проведени допълнителни изпитания за целите на класифицирането и етикетиранието. Методът за изпитване НППР е с обща точност от 79 % (113/143) до 81 % (119/147), неверни положителни резултати 19 % (20/103) до 21 % (22/103), и неверни отрицателни резултати 16 % (7/43) до 25 % (10/40), в сравнение с данните от *in vivo* метода за изпитване със заешки очи, класифицирани по системите за класифициране на EPA (1), EU (2), или GHS (3). Когато от базата данни бъдат изключени вещества от определени химични (напр. алкохоли, кетони) или физични (напр. твърди вещества) класове, точността на метода НППР в системите за класифициране на EU, EPA, и GHS варира от 87 % (72/83) до 92 % (78/85), неверните положителни резултати варират от 12 % (7/58) до 16 % (9/56), а неверните отрицателни резултати — от 0 % (0/27) до 12 % (3/26).
45. Дори когато дадено изпитвано вещество не получи класификация като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, данните от анализа за НППР могат да бъдат от полза съвместно с данните от *in vivo* изпитанията със заешки очи или от съответно валидирани *in vitro* изпитания за по-нататъшната оценка на ползата и ограниченията на метода за изследване НППР за определяне на вещества без силно дразнещо действие и без дразнещо действие (в процес на разработване е Ръководство за използването на *in vitro* метод за изпитване за токсично действие върху очите).

Критерии за приемане на изпитанието

46. Едно изпитание се смята за приемливо когато положителната контрола дава оценка ИВБОДД, попадаща в границите между две стандартни отклонения от текущата средна стойност за предишни изследвания, която се актуализира най-малко на всеки три месеца, или всеки път когато в лаборатории, в които рядко се провеждат изпитания (напр. по-рядко от веднъж месечно), бъде проведено приемливо изпитание. Реакциите от отрицателната контрола или от контролата „разтворител/носител“ следва да дават резултати със стойности за непрозрачност и пропускливост, които са по-ниски от установените горни граници за стойностите за фонова непрозрачност и пропускливост за говежда роговица, третирана със съответната отрицателна контрола или контрола „разтворител/носител“.

Доклад за теста

47. Докладът за теста следва да включва следната информация, когато тя се отнася за провеждането на изпитанието:

Изпитвани и контролни вещества

Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата CAS, следвано от други наименования, ако са известни такива наименования;

Регистрационен номер CAS (RN), ако е известен;

Чистота и състав на веществото или сместа (в топлинни проценти), доколкото се разполага с такава информация;

Физикохимични свойства, като например физично състояние, летливост, киселинност, устойчивост, химичен клас, водоразтворимост, отнасящи се до проведеното изследване;

Обработка на изпитваните/контролни вещества преди изпитанието, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);

Устойчивост, ако е известна.

Информация за финансиращото лице и за изпитателната лаборатория

Име и адрес на финансиращото лице, на изпитателната лаборатория и на ръководителя на изследването;

Идентификация на източника на очите (напр. клиницата, от която са взети);

Условия на съхранение и транспорт на очите (напр. дата и час на вземане, период от време преди започване на изпитанието, среда и температурни условия, в които са транспортирани, използвани антибиотици);

Ако са налични, специфичните характеристики на животните, от които са взетите очи (напр. възраст, пол, телно на животното - донор).

*Аргументация на използваните методи за изпитване и протокол**Адекватност на метода за изпитване*

Процедурата, използвана за осигуряване на адекватност (напр. точност и надеждност) на метода за изпитване във времето (напр. периодично изпитване на опитни вещества, използване на отрицателни и положителни контролни данни от предишни изпитания).

Критерии за приемане на изпитанието

Приемливи съответни положителни и отрицателни контролни диапазони, основани на данни от предишни изпитания;

Ако са приложими, приемливи съответни сравнителни контролни диапазони, основани на данни от предишни изпитания.

Тестови условия

Описание на използваната тестова система;

Вид на използвания държател за роговицата;

Информация за калибровката на уредите, използвани за измерване на непрозрачност и пропускливост (напр. уред за измерване на непрозрачност и спектрофотометър);

Информация за използваните говежди роговици, включително декларация за качеството им;

Подробности за използваната процедура за изпитване;

Използвани концентрации на изпитваното вещество;

Описание на евентуални модификации на процедурата за изпитване;

Позоваване на данни от предишни изпитания на модела (напр. отрицателни и положителни контроли, опитни вещества, сравнителни контролни вещества);

Описание на използваните критерии за оценка.

Резултати

Таблицы с данни за отделни изпитвани проби (напр. стойности за непрозрачност и OD₄₉₀ и изчислени оценки ИВБОДЦ за изпитваното вещество и положителните, отрицателните и сравнителни контроли (ако са включени), докладвани в табличен вид, включително данни от повторни експерименти, когато е приложимо, и средни стойности ± стандартното отклонение за всеки експеримент);

Описание на други наблюдавани ефекти.

Обсъждане на резултатите

Заклучение

ЛИТЕРАТУРА

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕС и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006. ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. На разположение на адрес:

[\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html\]](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. На разположение на адрес:

[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](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. 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 Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес:

[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)
- (6) Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕО на Съвета и директиви 91/155/ЕО, 93/67/ЕО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията. ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. На разположение на адрес:

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

- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. 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 Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
- (10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. На разположение на адрес:

[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. На разположение на адрес:

[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. На разположение на адрес:

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

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: Близостта до съответствие между резултатите от метода за изпитване и приетите еталонни стойности. Тя е мярка за функционалните характеристики на метода за изпитване и един аспект на „приложимостта“. Често терминът се използва взаимозаменяемо със „съгласуваност“, и означава делът на правилните резултати от даден метод за изпитване.

Сравнително контролно вещество: Вещество, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно сравнително контролно вещество следва да притежава следните свойства; (i) постоянен и надежден източник(-ци); (ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; (iii) известни физични/химични характеристики; (iv) потвърждаващи данни за известни въздействия, и (v) известна ефективност за постигане на желаната реакция.

Роговица: Прозрачната част на предната страна на очната ябълка, която покрива ириса и зеницата и пропуска светлината навътре.

Непрозрачност на роговицата: Мярка за степента на непрозрачност на роговицата след експониране на въздействието на изпитваното вещество. Повишената непрозрачност на роговицата е показател за увреждане на роговицата. Непрозрачността може да се оценява субективно, както това става в изпитването Draize със заешки очи, или обективно с инструмент, наречен „уред за измерване на непрозрачност.“

Пропускливост на роговицата: Количествена мярка за увреждане на епителия на роговицата чрез определяне на количеството натриев флуоресцеинов оцветител, преминаващо през всички клетъчни слоеве на роговицата.

Категория 1 на ЕРА: Корозивно въздействие (необратимо разрушаване на очната тъкан), или въздействие върху роговицата, или дразнене, траещи повече от 21 дни (1).

Категория R41 на ЕС: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (2).

Дял на неверните отрицателни резултати: Пропорцията на всички невярно определени отрицателни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи положителен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

Дял на неверните положителни резултати: Пропорцията на всички невярно определени положителни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи отрицателен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали): Система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, съобщения за опасност, съобщения за предпазни мерки и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (3).

Категория 1 по GHS: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (3).

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб)популация бъдат експонирани на този агент.

In Vitro балова оценка за дразнещо действие (ИВБОУД): Емпирично получена формула, използвана в анализа за НПГР, при която средните стойности за непрозрачност и пропускливост за всяка третирана група се комбинират в една *in vitro* балова оценка за всяка третирана група. ИВБОУД = средната стойност за непрозрачност + (15 x средната стойност за пропускливост).

Отрицателна контрола: Нетретирано точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система. Тази проба се провежда паралелно с проби, третирани с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне доколко разтворителят взаимодейства с тестовата система.

Вещество без дразнещо действие: Веществата, които не се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категории I, II, или III на ЕРА; Категории R41 или R36 на ЕС; или Категории 1, 2A, или 2B на GHS.

Вещество с корозивно действие върху очите: (а) Вещество, което причинява необратимо тъканно увреждане на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на ЕРА, или Категория R41 на ЕС (1) (2) (3).

Вещество с дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява обратимо изменение на окото след прилагане върху предната повърхност на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория II или III на ЕРА, Категория R36 на ЕС, или Категория 2A или 2B на GHS (1) (2) (3).

Вещество със силно дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява тъканно увреждане на окото след прилагане върху предната повърхност на окото, което не преминава до 21 дни след прилагането или причинява сериозно физическо влошаване на зрението; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1) (2) (3).

Уред за измерване на непрозрачност: Инструмент, използван за измерване на „непрозрачността на роговицата“ чрез количествена оценка на пропусканата през роговицата светлина. Типичният инструмент има две отделения, всяко със свой собствен светлинен източник и фотоклетка. Едното отделение се използва за третираната роговица, а другото се използва за калибриране и нулиране на инструмента. Светлината от халогенна лампа се изпраща през едно контролно отделение (празно отделение без прозорци или течност) към фотоклетка и се сравнява със светлината, изпращана към друга фотоклетка през експерименталното отделение, в което се намира отделението с роговицата. Разликата в пропусканата през фотоклетките светлина се сравнява и на цифровия екран се изписва цифрова стойност за непрозрачността.

Положителна контрола: Точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система и третирано с вещество, за което е известно, че индуцира положителна реакция. За да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на острата реакция не следва да е прекомерно голяма.

Надеждност: Мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да бъде провеждан възпроизводимо във времето в рамките на и между различни лаборатории, когато за провеждането му се използва един и същ протокол. Оценката за нея се прави като се изчислява между- и вътрешнолабораторната възпроизводимост и междулабораторната повторемост.

Контрола „разтворител/носител“: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена тестова система, включително разтворителя или носителя, която е третирана с проби, обработени с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне на базовата реакция на обработените проби с изпитваното вещество, разтворено в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола, тази проба показва също доколко разтворителят или носителът взаимодействат с тестовата система.

Поетапно изпитване: Стратегия за стъпаловидно изпитване, при която цялата съществуваща информация за дадено изпитвано вещество се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се оценява значимостта на данните — за определяне доколко съществува достатъчно информация, за да се вземе решение за класифициране на веществото като опасно, преди да се премине към следващия етап. Ако дадено изпитвано вещество може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако дадено изпитвано вещество не може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи недвусмислена класификация.

Валидиран метод за изпитване: Метод за изпитване, за който са извършени валидиращи изследвания за определяне на приложимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод за изпитване може да не притежава достатъчно функционални характеристики по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел.

Оценяване на значимостта на данните: Процесът на отчитане на силните и слаби страни на различни видове информация за достигане до и в подкрепа на дадено заключение относно потенциалната опасност на едно вещество.

Допълнение 2

Опитни вещества за метода за изпитване НППР

Преди редовно използване на метод за изпитване, който се придържа към настоящия, лабораториите могат да докажат техническа компетентност като правилно определят класификацията за корозивно действие върху очите за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1. Тези вещества са подбрани като представителни за редица реакции на локално дразнещо/корозивно действие върху окото, въз основа на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (TG 405) (т.е. Категории 1, 2A, 2B, или Некласифицирано и неетикетирано съгласно глобалната система на ОН GHS (3) (7)). От друга страна, предвид валидираното предназначение на тези анализи (т.е. за определяне само на вещества с корозивно/ силно дразнещо действие върху очите), съществуват само два възможни тестови резултата за целите на класифицирането, с които да се докаже компетентност (вещества с корозивно/силно дразнещо действие или вещества без корозивно/силно дразнещо действие). Други критерии, които бяха използвани за подбор на посочените вещества са: наличието на веществата на пазара, съществуването на висококачествени *in vivo* еталонни данни и съществуването на висококачествени данни от двата метода *in vitro*, за които се разработва Ръководство за изпитване. Поради тази причина, веществата с дразнещо действие са подбрани от препоръчителния списък на ICCVAM с 122 еталонни вещества за валидиране на *in vitro* методи за изпитване на токсичност върху очите (вж. Допълнение Н: Препоръчителни еталонни вещества на ICCVAM) (5). Еталонните данни са дадени в документацията на ICCVAM за метода за изпитване НППР и метода с изолирани птичи очи (ИПО) (17) (18).

Таблица 1

Препоръчвани вещества за доказване на техническа опитност по отношение на НППР

Вещество	CASRN	Химичен клас ⁽¹⁾	Физична форма	In Vivo Класификация ⁽²⁾	In Vitro Класификация ⁽³⁾
Бензалкониев хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониево съединение	Течност	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Хлорхексидин	55-56-1	Амин, Амидин	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Дибензоил-L-винена киселина	2743-38-6	Карбоксилна киселина, естер	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Имидазол	288-32-4	Хетероциклен	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Трихлороацетилова киселина (30 %)	76-03-9	Карбонова киселина	Течност	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
2,6-Дихлоробензоил хлорид	4659-45-4	Киселинен халид	Течност	Категория 2A	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
Етил-2-метил ацетоацетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2B	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо вещество	Категория 2A	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
Глицерин	56-81-5	Алкохол	Течност	Неетикетирано	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
n-Хексан	110-54-3	Въглеродород (ацикличен)	Течност	Неетикетирано	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие

Съкращения: CASRN = Номер по регистъра на справочната служба по химикали

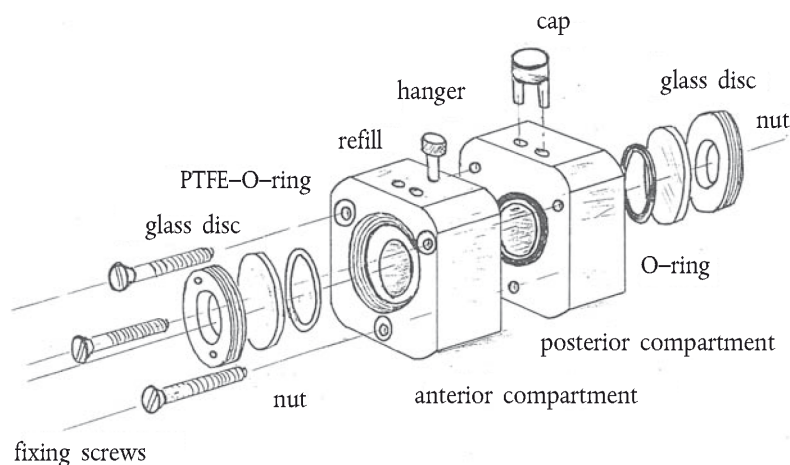
⁽¹⁾ За всяко изпитвано вещество е определен химичен клас, като за целта се използва стандартна схема за класификация, базираща се на системата за класификация MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (на разположение на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Базира се на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (ОИСП TG 405) и се използва глобалната система GHS на ОН (3)(7).⁽³⁾ Базира се на резултати от изпитване за НППР и ИПО.

Допълнение 3

ДЪРЖАТЕЛ ЗА РОГОВИЦА ЗА НППР

1. Държателите за роговицата за НППР са изработени от инертен материал (напр. полипропилен). Държателите се състоят от две части (предно и задно отделение) и имат две сходни цилиндрични вътрешни отделения. Всяко отделение е с вместимост 5 mL и завършва със стъклен прозорец, през който се отчитат стойностите за непрозрачността. Всяко от вътрешните отделения е с диаметър 1,7 cm и дълбочина 2,2 cm ⁽¹⁾. За да се избегнат течове се използва О-пръстен, разположен върху задното отделение. Роговиците се поставят с ендотелиалната страна надолу върху О-пръстена на задните отделения, а предните отделения се поставят върху епителиалната страна на роговиците. Отделенията се закрепват с три неръждаеми винта, разположени по външните краища на отделението. В края на всяко отделение се намира стъклен прозорец, който може да се сваля за улесняване достъпа до роговицата. Между стъкления прозорец и отделението също е поставен О-пръстен за защита от течове. Два отвора върху горната страна на всяко отделение позволяват поставяне и изваждане на средата и на изпитваните съединения. По време на третирането и инкубацията те се затварят с гумени капачки.

⁽¹⁾ Дадените размери са за държател на роговица, използван за крави на възраст между 12 и 60 месеца. В случай че се използват животни на възраст от 6 до 12 месеца, държателят ще трябва да се конструира така, че всяко отделение да е с вместимост 4 mL, а всяко от вътрешните отделения да е с диаметър 1,5 cm и дълбочина 2,2 cm. При всяка нова конструкция за държател за роговица е важно съотношението между експонираната повърхностна площ на роговицата и обема на задното отделение да се запази както при традиционния държател. Това е необходимо, за да се осигури стойностите за пропускливост да бъдат правилно определени за изчисляването на ИВБОДЦ по предлаганата формула.



Превод на надписите на фигурата:

Glass disc: Стъклен диск

PTFE-O-ring: политетрафлуороетиленов O-пръстен

Refill: отвор за пълнене

Hanger: кука

Cap: капачка

Nut: гайка

O-ring: O-пръстен

Posterior compartment: задно отделение

Anterior compartment: предно отделение

Fixing screws: застопоряващи винтове

УРЕДЪТ ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА НЕПРОЗРАЧНОСТ

- Уредът за измерване на непрозрачност е инструмент за измерване на пропусканата светлина. Светлината от халогенна лампа се изпраща през едно контролно отделение (празно отделение без прозорци или течност) към фотоклетка и се сравнява със светлината, изпращана към друга фотоклетка през експерименталното отделение, в което се намира отделението с роговицата. Разликата в пропусканата през фотоклетките светлина се сравнява и на цифровия екран се изписва цифрова стойност за непрозрачността. Определят се единиците за непрозрачност.
- Уредът за измерване на непрозрачност следва да реагира линейно, като отчита диапазон от стойности за непрозрачността, който обхваща референтните стойности, използвани за различните класификации, описани в Прогнозния модел (т.е. до референтната стойност, която определя корозивното/силно дразнещото действие). За да се гарантират линейно и точно отчетени стойности до 75-80 единици непрозрачност е необходимо уредът да се калибрира като се използва серия от калибри. Калибрите (непрозрачни полиестерни листове) се поставят в калибриращото отделение (отделение за роговицата, предназначено за поставяне на калибрите) и се отчитат с уреда за измерване на непрозрачност. Калибриращата камера е предвидена да помества калибрите на приблизително същото разстояние между източника на светлината и фотоклетката, на което се разполагат роговиците по време на измерването за непрозрачност. Уредът за измерване на непрозрачност най-напред се калибрира за 0 единици непрозрачност като се използва калибриращото отделение без калибър. След това в калибриращото отделение последователно се поставят три различни калибри и се измерва непрозрачността им. Калибри 1, 2 и 3 следва да дават стойности за непрозрачността равни на зададените им съответно 75, 150, и 225 единици $\pm 5\%$.

Б. 48 МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗОЛИРАНИ ПТИЧИ ОЧИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЕЩЕСТВА С КОРОЗИВНО И СИЛНО ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ**ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Методът за изпитване с изолирани птичи очи (ИПО) е *in vitro* метод за изпитване, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения за класифициране на вещества и смеси с корозивно и силно дразнещо действие върху очите, (1) (2) (3). За целите на този метод за изпитване, като вещества със силно дразнещо действие се дефинират такива, които предизвикват лезии върху очите на заек, продължаващи най-малко 21 дни след прилагането. Въпреки че не се смята за валиден като пълен заместител на *in vivo* тестът върху заешки очи, методът с ИПО се препоръчва да се използва като част от една поетапна стратегия за изпитване за регулаторно класифициране и етикетирание в обхвата на конкретна област на приложимост (4) (5). Изпитваните вещества и смеси (6), които реагират положително на този анализ, могат да се класифицират като вещества с корозивно или силно дразнещо действие върху очите без по-нататъшно изпитване при зайци. Вещества, които покажат отрицателен резултат, е необходимо да се изпитват при зайци като се прилага стратегия за последователно изпитване, както това е разгледано в Ръководството за изпитания на ОИСП 405 (7) (глава Б.5 в настоящото приложение).
2. Целта на този метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалното корозивно или силно дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество, измерени чрез способността му да индуцира токсичност върху извадени птичи очи. Токсичният ефект върху роговицата се измерва чрез: (i) качествена оценка на непрозрачността, (ii) качествена оценка на увреждането на епителия при прилагане върху окото на флуоресцентен оцветител (запържане на флуоресцентен оцветител), (iii) количествено измерване на увеличената дебелина (подуване), и (iv) качествена оценка на макроскопичните морфологични увреждания по повърхността. Оценка за непрозрачност, подуване и увреждане на роговицата след експониране на изпитваното вещество се определят поотделно, след което се комбинират, за да се направи Класификация за дразнещо действие върху очите.
3. Вещества с дразнещо действие върху очите, предизвикващи лезии, които преминават за по-малко от 21 дни на вещества без дразнещо действие са изпитвани също и по метода на изпитване с ИПО. Въпреки това, не е направена официална оценка за точността и надеждността на метода за изпитване с ИПО за тези категории вещества.
4. Определенията са дадени в Допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Този метод за изпитване се базира на Протокола за метода за изпитване с ИПО (8) на Междудевомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM), който бе изготвен след едно международно изследване за валидиране (4) (5) (9), за което принос имаха Европейският център за валидиране на алтернативни методи, Японският център за валидиране на алтернативни методи и TNO Катедра „Качество на живот“ към Токсикология и приложна фармакология (Холандия). Протоколът се базира на информация, получена от публикувани протоколи, както и на текущия протокол, използван от TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. Установените ограничения на този метод за изпитване се базират на равнищата на неверните положителни резултати за алкохоли и равнищата на неверните отрицателни резултати за твърди и повърхностно активни вещества (вж. точка 47) (4). Когато веществата от този химичен и физичен клас бъдат изключени от базата данни, точността на ИПО навсякъде в системите за класификация на ЕС, ЕРА и Глобалната система за хармонизиране на класификацията на химични вещества и смеси GHS значително се подобрява (4). Според целта на този анализ (т.е. да се определят само веществата с корозивно/силно дразнещо действие върху очите) неверните отрицателни резултати не са от критично значение, тъй като такива вещества се тестват впоследствие при зайци или чрез други съответно валидирани *in vitro* изпитания в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, отчитащ значимостта на различните видове данни. Освен това текущата база данни за валидирането не позволяваше да бъде направена адекватна оценка на някои класове химикали или продукти (напр. смеси). Въпреки това изследователите биха могли да използват този метод за изпитване на всякакви видове материал (включително за смеси), като положителният резултат може да се приеме за показател за корозивно или силно дразнещо действие върху очите. Все пак положителни резултати, получени от алкохоли следва да се тълкуват предпазливо, поради риска от свръхпрогнозиране на опасност.
7. Всички процедури с птичи очи следва да съответстват на приложимите за изпитвателната лаборатория разпоредби и процедури за работа с материали с хуманен или животински произход, които включват, но не се ограничават само с тъкани и тъканна течност. Препоръчва се спазването на универсалните лабораторни предпазни мерки (15).
8. Едно ограничение на метода за изпитване е фактът, че въпреки че той отчита някои от действията върху очите, изследвани с метода за изследване на дразнещо действие върху заешки очи, и до известна степен отчита и силата на това действие, той не взема под внимание уврежданията на конюнктивата и ириса. Също така, въпреки че с метода за изпитване с ИПО не може да се направи оценка *per se* на обратимостта на лезиите върху роговицата, бе предложено въз основа на изследванията върху заешки очи оценката за първоначалната дълбочина на увреждането на роговицата да се използва за разграничаването на необратимото от обратимото действие (16). В заключение, методът за изпитване с ИПО не позволява да се направи оценка на потенциала за системно токсично действие, свързано с експонирането на очите.
9. Продължават усилията да се охарактеризират допълнително ползата и ограниченията на методът за изпитване с ИПО за определянето на вещества със слабо или без дразнещо действие (вж. също точка 48). Приканват се потребителите да предоставят на валидиращите организации проби и/или данни за официално оценяване на възможните бъдещи приложения на метода за изпитване с ИПО, включително и за определяне на вещества със слабо или без дразнещо действие върху очите.

10. Всяка лаборатория, която за първи път започва да извършва такива анализи, следва да използва опитните химикали, посочени в Допълнение 2. Лабораториите могат да използват тези химикали за доказване на своята техническа компетентност за прилагане на метода за изпитване с ИПО преди предаване на данните от анализа на ИПО за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

11. Методът за изпитване с ИПО е органотипен модел, който осигурява краткотрайно поддържане на птичето око *in vitro*. При този метод за изпитване увреждането, причинено от изпитваното вещество, се оценява посредством определяне на подуването, непрозрачността и задържането на флуоресцеин от роговицата. Докато последните два параметъра се оценяват качествено, анализът на подуването на роговицата се извършва количествено. Всяко измерване се преобразува в количествен резултат, който се използва за изчисляване на един общ Коефициент на дразнимост, или му се дава качествена категоризация, използвана за *in vitro* класификация на корозивно и силно дразнещо действие върху очите. След това всеки от тези резултати може да се използва за предвиждане на *in vivo* потенциала за корозивно и силно дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество (вж. критериите за решението).

Източник и възраст на птичите очи

12. Традиционно за този анализ се използват очи от птици, събрани в клиника където птиците се убиват за консумация от човека, като така отпада необходимостта от лабораторни животни. Използват се само очи на здрави животни, смятани за подходящи за включване в хранителната верига на човека.
13. Въпреки че не е провеждано контролирано изследване за оценка на оптималната възраст, възрастта и теглото на птиците, които традиционно се използват в този метод за изпитване, са тези на пилетата, които традиционно се обработват в птичекланици (т.е. на възраст приблизително 7 седмици, 1,5 – 2,5 kg).

Събиране и транспортиране на очите до лабораторията

14. Главите следва да се отстраняват незабавно след седиране на птиците, което обикновено става чрез електрически шок, и след срязване на шията за изтичане на кръвта. Източникът на птичи материал следва да е разположен в близост до лабораторията, за да може главите да се прехвърлят от клиниката в лабораторията достатъчно бързо, за да се сведе до минимум влошаването и/или бактериалното замърсяване. Интервалът от време между събирането на птичите глави и използването на очите за метода за изпитване с ИПО следва да бъде сведен до минимум (обикновено до два часа) и следва убедително да се покаже, че не компрометира резултатите от анализа. Тези резултати се базират на критериите за подбор на очите, както и на реакцията на положителната и отрицателната контрола. Всички очи, използвани за анализа, следва да бъдат от една и съща група очи, събрани през даден ден.
15. Тъй като дисекцията на очите се извършва в лабораторията, целите глави се транспортират от клиниката при стайна температура в пластмасови кашони, овлажнени с кърпи, натопени в изотоничен солен разтвор.

Критерии за избор на очи, използвани за метода ИПО

16. Очите с високо базово флуоресцеиново оцветяване (напр. > 0,5) или с висока базова непрозрачност на роговицата (напр. > 0,5) след изваждане се изхвърлят.
17. Всяка третирана група и паралелна положителна контрола се състои от минимум три очи. Отрицателната контролна група или контролата „разтворител“ (ако се използва разтворител, различен от солен разтвор) се състои от минимум едно око.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка на очите

18. Клепачите внимателно се изрязват, като се внимава да не се нарани роговицата. Целостта на роговицата бързо се проверява с капка 2 % (w/v) натриев флуоресцеин, приложен върху повърхността на роговицата в продължение на няколко секунди и след това се изплаква с изотоничен солен разтвор. След това обработените с флуоресцеин очи се изследват с микроскоп с шпалт-лампа, за да се провери дали роговицата не е увредена (т.е. задържането на флуоресцеин и непрозрачността на роговицата трябва да са ≤ 0,5).
19. Ако не е увредено, окото се изрязва от черепа, като се внимава да не се нарани роговицата. Очната ябълка се изважда от орбитата, като мигателната ципа се държи здраво с хирургически форцепс, а очните мускули се срязват с извита ножица с тъп връх. Важно е да се избегне нараняването на роговицата от прекомерен натиск (т.е. артефакти, деформирани от натиск).
20. Когато окото се извади от орбитата към него трябва да остане закрепена една видима част от очния нерв. След като вече бъде извадено от орбитата окото се поставя върху абсорбираща подложка и се изрязват мигателната ципа и останалата свързваща тъкан.

21. Изваденото око се поставя в скоба от неръждаема стомана, като роговицата се разполага вертикално. След това скобата се пренася в камерата на обливащ апарат (superfusion apparatus) (16). Лампите следва да бъдат разположени в обливащия апарат така че цялата роговица да може да се облее с изотоничния солен разтвор. Камерите на обливащия апарат трябва да бъдат с контролирана температура от $32 \pm 1,5$ °C. В Допълнение 3 е дадена схема на един типичен обливащ апарат и на скобите за очи, които могат да бъдат закупени или изработени. Апаратът може да се модифицира според нуждите на всяка лаборатория (напр. за побиране на различен брой очи).
22. След поставяне в обливащия апарат очите отново се оглеждат с микроскоп с шпалт-лампа, за да се провери дали не са наранени по време на дисекцията. На този етап се измерва и дебелината в най-високата точка на роговицата като се използва дълбокомерът на микроскопа с шпалт-лампа. Очите с: (i), задържане на флуоресцеин $> 0,5$; (ii) непрозрачност на роговицата $> 0,5$; или, (iii), други признаци на увреждане, се подменят. От очите, които не отпаднат на базата на някой от тези критерии, отпадат очите с дебелина на роговицата, отклоняваща се с повече от 10 % от средната стойност за всички очи. Потребителите следва да имат предвид, че микроскопите с шпалт-лампа може да отчитат различни стойности за дебелината на роговицата при различни настройки за шпалт-широчината. Шпалт-широчината следва да се настрои на 0,095 mm.
23. След като всички очи бъдат подложени на оглед и одобрени, те се инкубират в продължение на приблизително 45 до 60 минути за уравнисяване спрямо тестовата система преди дозиране. След периода на уравнисяване се извършва нулево еталонно замерване на дебелината и непрозрачността на роговицата, което да служи за база при отчитането (напр. време = 0). За базово измерване при отчитането на резултатите за поглъщането на флуоресцеин служи отчетената стойност по този показател по време на дисекцията.

Прилагане на изпитваното вещество

24. Непосредствено след нулевите еталонни замервания окоето (в държателя му) се изважда от обливащия апарат като се поставя в хоризонтално положение и върху роговицата се прилага изпитваното вещество.
25. Течните изпитвани вещества обикновено се изпитват неразредени, но може да се разреждат ако това е необходимо (напр. като част от замисъла на изследването). Предпочитан разтворител за разреждане е физиологичният солен разтвор. Въпреки това, при контролирани условия могат да се използват и други разтворители, но трябва да се докаже уместността на разтворители, различни от физиологичния солен разтвор.
26. Течните изпитвани вещества се прилагат върху роговицата, така че цялата повърхност на роговицата да се покрие напълно с изпитваното вещество; стандартният обем е 0,03 mL.
27. Ако е възможно, твърдите вещества следва да бъдат натрошени възможно най-fino в хаван с чукало или подобно средство за натрошаване. Прахообразното вещество се прилага върху роговицата така че повърхността да се покрие равномерно с изпитваното вещество; стандартното количество е 0,03 g.
28. Изпитваното вещество (течно или твърдо) се прилага в продължение на 10 секунди и след това се отмива от окоето с изотоничен солен разтвор (приблизително 20 mL) при стайна температура. След това окоето (в държателя му) се връща в обливащия апарат в първоначалното му изправено положение.

Контроли

29. Във всеки експеримент се включват паралелни отрицателни или контроли „разтворител/носител“ и положителни контроли.
30. Когато се изпитват течности със 100 % концентрация или твърди вещества, за паралелна отрицателна контрола в метода за изпитване с ИПО се използва физиологичен солен разтвор за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за да се осигури, че опитните условия няма да доведат до неподходяща дразнителна реакция.
31. Когато се изпитват разреждени течности, в метода за изпитване се включва паралелна контролна група „разтворител/носител“ за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за да се осигури, че опитните условия няма да доведат до неподходяща дразнителна реакция. Както е посочено в точка 25, може да се използва само разтворител/носител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестовата система.

32. Във всеки експеримент се включва известно вещество с дразнещо действие върху очите като паралелна положителна контрола за удостоверяване индуцирането на съответната реакция. Тъй като при този метод за изпитване анализът на ИПО се използва за определяне на вещества с корозивно или силно дразнещо действие, положителната контрола следва да е еталонно вещество, което при този метод за изпитване индуцира остра реакция. Все пак, за да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на острата реакция не следва да е прекомерно голяма. За положителната контрола следва да се генерират достатъчни *in vitro* данни, за да може да се изчисли статистически дефиниран приемлив диапазон за положителната контрола. Ако за конкретна положителна контрола няма на разположение достатъчно данни от предишни изпитания с метода за изпитване с ИПО, може да е необходимо да се проведат изследвания за набавяне на такава информация.
33. Примери за положителна контрола за течни изпитвани вещества са 10 % оцетна киселина или 5 % бензалкониев хлорид, докато примери за положителна контрола за твърди изпитвани вещества са натриев хидроокис или имидазол.
34. Контролните сравнителни вещества са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен химичен или продуктово клас, или за оценка на съответния потенциал за дразнещо действие на вещества с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен диапазон от реакции на дразнене.

Измерени крайни резултати

35. Обработените роговици се оценяват преди третирането и 30, 75, 120, 180, и 240 (± 5) минути след последващото третиране с отмиване. Тези времеви точки осигуряват необходимия брой замервания през четиричасовия период на третиране, като същевременно между отделните измервания остава достатъчно време да се направят необходимите наблюдения върху всички очи.
36. Крайните показатели, които се оценяват са непрозрачност на роговицата, подуване на роговицата, задържане на флуоресцеин и морфологични изменения (напр. образуване на вълъбнатини или отпускане на епителия). Всички крайни резултати, с изключение на задържането на флуоресцеин (което се определя само преди третирането и 30 минути след експониране на изпитваното вещество) се определят във всяка от горните времеви точки.
37. Препоръчително е да се направят снимки за документиране на непрозрачността на роговицата, задържането на флуоресцеин, на морфологичните изменения и на хистопатологията, ако се провежда такова изследване.
38. След заключителното изследване след четири часа е добре потребителите да съхранят очите в подходящ фиксатор (напр. неутрален буферен формалинов разтвор) за евентуално хистопатологично изследване.
39. Подуването на роговицата се определя от измерванията на дебелината на роговицата, направени с оптичния пахиметър на микроскопа с шпалт-лампа. То се изразява процентно и се изчислява от измерванията на дебелината на роговицата по следната формула:

$$\left(\frac{\text{дебелина на роговицата във време } t - \text{дебелина на роговицата във време } t = 0}{\text{дебелина на роговицата във време } t = 0} \right) \times 100$$

40. Средната процентна стойност за подуването на роговицата за всички изпитвани очи се изчислява за всички времеви точки, в които се извършва измерване. На базата на най-високата средна стойност за подуване на роговицата, отчетена в която и да е времева точка, се определя обща балова оценка на категоризация за всяко изпитвано вещество.
41. Непрозрачността на роговицата се изчислява като за отчетането се използва площта от роговицата, която е най-плътна непрозрачна. Средната стойност за непрозрачност на роговицата за всички изпитвани очи се изчислява за всички времеви точки, в които се извършва измерване. На базата на най-високата средна стойност за непрозрачност на роговицата, отчетена в която и да е времева точка, се определя обща балова оценка на категоризация за всяко изпитвано вещество (Таблица 1).

Таблица 1

Балови оценки за непрозрачност на роговицата

Балова оценка	Наблюдение
0	Липсва непрозрачност
0,5	Много слаба непрозрачност

Балова оценка	Наблюдение
1	Разпръснати или дифузни области; ясно се виждат детайли от ириса
2	Лесно забележима полупрозрачна област; детайлите на ириса са леко замъглени
3	Силна непрозрачност на роговицата; не се наблюдават специфичните детайли на ириса; размерите на лещата едва се забелязват
4	Пълна непрозрачност на роговицата; ирисът не се вижда

42. Средната стойност за задържане на флуоресцеин за всички изпитвани очи се изчислява само за 30-минутната времева точка за отчитане, която се използва за определяне на общата балова оценка на категоризация за всяко изпитвано вещество (Таблица 2).

Таблица 2

Балови оценки за задържане на флуоресцеин

Балова оценка	Наблюдение
0	Липсва задържане на флуоресцеин
0,5	Много слабо едноклетъчно оцветяване
1	Едноклетъчно оцветяване, разпръснато по цялата третирана площ на роговицата
2	Фокално или сливащо се плътно едноклетъчно оцветяване
3	Сливащи се големи площи задържане на флуоресцеин в роговицата

43. Морфологичните изменения включват „образуване на вдлъбнатини“ по епителните клетки на роговицата, „отпускане“ на епителния, „грапавост“ на повърхността на роговицата и „залепване“ на изпитваното вещество по роговицата. Тези наблюдавани изменения могат да са с различна тежест и да възникват едновременно. Класифицирането на тези наблюдения е субективно според интерпретацията на изследователя.

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Оценка на данните

44. Резултатите за непрозрачност на роговицата, подуване и задържане на флуоресцеин следва да бъдат оценени поотделно, за да се определи ИПО-клас за всеки краен резултат. След това ИПО-класовете за всеки краен резултат се комбинират, за да се направи Класификация за дразнещо действие за всяко изпитвано вещество.

Критерии за решението

45. След като се направи оценка на всеки краен резултат, могат да се определят ИПО-класовете на базата на един предварително зададен диапазон. Интерпретирането на дебелината на роговицата (Таблица 3), непрозрачността (Таблица 4), и задържането на флуоресцеин (Таблица 5) с помощта на четири ИПО-класа се извършва съгласно следните скали:

Таблица 3

Критерии за ИПО класифициране за дебелина на роговицата

Средно подуване на роговицата (%) (*)	ИПО клас
0 до 5	I
> 5 до 12	II
> 12 до 18 (> 75 min след третиране)	II
> 12 до 18 (≤ 75 min след третиране)	III
> 18 до 26	III

Средно подуване на роговицата (%) (*)	ИПО клас
> 26 до 32 (> 75 min след третиране)	III
> 26 до 32 (≤ 75 min след третиране)	IV
> 32	IV

(*) Баловите оценки за подуване на роговицата са приложими само ако дебелината се измерва с микроскоп с шпалт-лампа Haag-Streit ВР900 с дълбокомер № 1 и настройка за шпалт-широчината 9½, което се равнява на 0,095 mm. Потребителите следва да имат предвид, че микроскопите с шпалт-лампа може да отчитат различни стойности за дебелината на роговицата при различни настройки за шпалт-широчината.

Таблица 4

Критерии за ИПО класифициране за непрозрачност

Средна максимална балова оценка за непрозрачност (*)	ИПО клас
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Вж. Таблица 1.

Таблица 5

Критерии за ИПО класифициране за средно задържане на флуоресцеин

Средна балова оценка за задържане на флуоресцеин след 30 минути последващо третиране (*)	ИПО клас
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Вж. Таблица 2.

46. Общата *in vitro* класификация за дразнещо действие на дадено изпитвано вещество се оценява като се отчита класификацията за дразнещо действие, която съответства на комбинацията от категории, получени за подуване на роговицата, непрозрачност на роговицата и задържане на флуоресцеин и като се прилага схемата, представена на Таблица 6.

Таблица 6

Обща *in vitro* класификация за дразнещо действие

Класификация	Комбинация от 3 крайни резултата
Вещество с корозивно/силно дразнещо действие	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Непрозрачност на роговицата ≥ 3 при 30 min (в най-малко 2 очи) Непрозрачност на роговицата = 4 във всяка времева точка (в най-малко 2 очи) Силно отпускане на епителния (в най-малко 1 око)

(*) Комбинации, за които има по-слаба вероятност да се получат.

47. Както бе споменато в точка 1, когато изпитваното вещество не се определи като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, следва да бъдат проведени допълнителни изпитвания за целите на класифицирането и етикетирването. Методът за изпитване с ИПО е с обща точност от 83 % (120/144) до 87 % (134/154), неверни положителни резултати 6 % (7/122) до 8 % (9/116), и неверни отрицателни резултати 41 % (13/32) до 50 % (15/30) за определяне на вещества с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, в сравнение с данните от *in vivo* метода за изпитване със заешки очи, класифицирани по системите за класифициране на ЕРА (1), ЕС (2), или GHS (3). Когато от базата данни бъдат изключени вещества от определени химични (напр. алкохоли и повърхностно активни вещества) и физични (напр. твърди вещества) класове, точността на метода ИПО в системите за класифициране на ЕС, ЕРА, и GHS варира от 91 % (75/82) до 92 % (69/75), неверните положителни резултати варират от 5 % (4/73) до 6 % (4/70), а неверните отрицателни резултати - от 29 % (2/7) до 33 % (3/9) (4).
48. Дори когато дадено изпитвано вещество не получи класификация като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, данните от анализа за ИПО могат да бъдат от полза съвместно с данните от *in vivo* изпитанията със заешки очи или от съответно валидирани *in vitro* изпитания за по-нататъшната оценка на ползата и ограниченията на метода за изследване ИПО за определяне на вещества без силно дразнещо действие и без дразнещо действие (в процес на разработване е Ръководство за използването на *in vitro* метод за изпитване за токсично действие върху очите).

Критерии за приемане на изпитанието

49. Едно изпитание се смята за приемливо когато паралелната отрицателна или контрола „разтворител/носител“ и паралелната положителна контрола дават класификация за дразнещо действие, която попада съответно в границите на класовете вещества без силно дразнещо действие и вещества със силно дразнещо/корозивно действие.

Доклад от теста

50. Докладът за теста следва да включва следната информация когато тя се отнася за провеждането на изпитанието:

Изпитвани и контролни вещества

Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата CAS, следвано от други наименования, ако са известни;

Регистрационен номер CAS (RN), ако е известен;

Чистота и състав на веществото или сместа (в тегловни проценти), доколкото се разполага с такава информация;

Физикохимични свойства, като например физично състояние, летливост, киселинност, устойчивост, химичен клас, водоразтворимост, отнасяща се до проведеното изследване;

Обработка на изпитваните/контролни вещества преди изпитанието, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);

Устойчивост, ако е известна.

Информация за финансиращия и за изпитателната лаборатория

Име и адрес на финансиращия, на изпитателната лаборатория и на ръководителя на изследването;

Идентификация на източника на очите (напр. клиниката, от която са събрани);

Условия на съхранение и транспорт на очите (напр. дата и час на събиране, период от време преди започване на изпитанието);

Ако са налични, специфичните характеристики на животните, от които са събрани очите (напр. възраст, пол, тегло на животното - донор).

Аргументация на използваните методи за изпитване и протокол

Цялостност на метода за изпитване

Процедурата, използвана за осигуряване на цялостност (напр. точност и надеждност) на метода за изпитване във времето (напр. периодично изпитване на опитни вещества, използване на отрицателни и положителни контролни данни от предишни изпитания).

Критерии за приемане на изпитанието

Ако са приложими, приемливи съответни сравнителни контролни диапазони, основани на данни от предишни изпитания.

Тестови условия

Описание на използваната тестова система;

Модел на използвания микроскоп с шпалт-лампа (напр. модел);

Инструментални настройки на използвания микроскоп с шпалт-лампа

Информация за използваните птичи очи, включително декларация за качеството им;

Подробни данни за използваната процедура за изпитване;

Използвани концентрации на изпитваното вещество;

Описание на евентуални модификации на процедурата за изпитване;

Позоваване на данни от предишни изпитания на модела (напр. отрицателни и положителни контроли, опитни вещества, сравнителни контролни вещества);

Описание на използваните критерии за оценка.

Резултати

Описание на други наблюдавани ефекти;

Ако са приложими, снимки на окото.

Коментар на резултатите.

Заклучение.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирването и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕС и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006. ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. На разположение на адрес:

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

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

[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. На разположение на адрес:

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

- (6) Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕИО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕИО на Съвета и директиви 91/155/ЕИО, 93/67/ЕИО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията. ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. На разположение на адрес:
[\[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html\]](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm)
- (9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. На разположение на адрес:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm)
- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). На разположение на адрес:
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](http://ecvam.jrc.it/index.htm)
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. На разположение на адрес:
[\[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf\]](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf).
- (16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
- (18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. На разположение на адрес:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)
- (19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. На разположение на адрес:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: Близостта до съответствие между резултатите от метода за изпитване и приетите еталонни стойности. Тя е мярка за функционалните характеристики на метода за изпитване и един аспект на „приложимостта“. Често терминът се използва взаимозаменяемо със „съгласуваност“ и означава делът на правилните резултати от даден метод за изпитване.

Сравнително контролно вещество: Вещество, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно сравнително контролно вещество следва да притежава следните свойства; (i) постоянен и надежден източник(-щи); (ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; (iii) известни физични/химични характеристики; (iv) потвърждаващи данни за известни въздействия, и (v) известна ефективност за постигане на желаната реакция

Роговица: Прозрачната част на предната страна на очната ябълка, която покрива ириса и зеницата и пропуска светлината навътре.

Непрозрачност на роговицата: Мярка за степента на непрозрачност на роговицата след експониране на въздействието на изпитваното вещество. Повишената непрозрачност на роговицата е показател за увреждане на роговицата.

Подуване на роговицата: Обективно измерване при изпитването ИПО за степента на разширение на роговицата след експониране на въздействието на изпитваното вещество. Изразява се като процентна стойност и се изчислява от базовите (преди дозиране) измервания за дебелината на роговицата и дебелината, отчитана през редовни интервали от време след експониране на изпитвания материал в изпитване с ИПО. Степента на подуване е показател за увреждането на роговицата.

Категория 1 на ЕРА: Корозивно въздействие (необратимо разрушаване на очната тъкан) или въздействие на роговицата или дразнене, траещи повече от 21 дни (1).

Категория R41 на ЕС: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (2).

Дял на неверните отрицателни резултати: Пропорцията на всички невярно определени отрицателни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи положителен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

Дял на неверните положителни резултати: Пропорцията на всички невярно определени положителни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи отрицателен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

Задържане на флуоресцеин: Субективно измерване при изпитването ИПО за степента на задържане на флуоресцеинов натрий от епителните клетки на роговицата след експониране на изпитваното вещество. Степента на задържане на флуоресцеин е показател за увреждането на епителния на роговицата.

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали): Система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, съобщения за опасност, съобщения за предпазни мерки и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (3).

Категория 1 по GHS: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (3).

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

Отрицателна контрола: Нетретирано точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система. Тази проба се провежда паралелно с проби, третираны с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне доколко разтворителят взаимодейства с тестовата система.

Вещество без дразнещо действие: Веществата, които не се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категории I, II, или III на EPA; Категории R41 или R36 на ЕС; или Категории 1, 2A, или 2B на GHS (1)(2)(3).

Вещество с корозивно действие върху очите: (а) Вещество, което причинява необратимо тъканно увреждане на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1)(2)(3).

Вещество с дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява обратимо изменение на окото след прилагане върху предната повърхност на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория II или III на EPA, Категория R36 на ЕС, или Категория 2A или 2B на GHS (1)(2)(3).

Вещество със силно дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява тъканно увреждане на окото след прилагане върху предната повърхност на окото, което не е обратимо до 21 дни след прилагането или причинява сериозно физическо влошаване на зрението. (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1)(2)(3).

Положителна контрола: Точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система и третирано с вещество, за което е известно, че индуцира положителна реакция. За да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на острата реакция не следва да е прекомерно голяма.

Надеждност: Мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да бъде провеждан възпроизводимо във времето в рамките на и между различни лаборатории, когато за провеждането му се използва един и същ протокол. Оценка за нея се прави като се изчислява между- и вътрешнолабораторната възпроизводимост и междулабораторната повторемост.

Микроскоп с шпалт-лампа: Инструмент, използван за непосредствен оглед на очите под увеличение с биокулярен микроскоп чрез създаване на стереоскопично изправено изображение. При метода ИПО този инструмент се използва за наблюдаване на предната структура на птичите очи, както и за обективно измерване на дебелината на роговицата с дълбокомера, с който е комплектован.

Контрол „разтворител/носител“: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена тестова система, включително разтворителя или носителя, която е третирана с проби, обработени с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне на базовата реакция на обработените проби с изпитваното вещество, разтворено в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола тази проба показва също доколко разтворителят или носителът взаимодействат с тестовата система.

Поетапно изпитване: Стратегия за стъпаловидно изпитване, при която цялата съществуваща информация за дадено изпитвано вещество се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се оценява значимостта на данните — за определяне доколко съществува достатъчно информация, за да се вземе решение за класифициране на веществото като опасно, преди да се премине към следващия етап. Ако дадено изпитвано вещество може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако дадено изпитвано вещество не може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи недвусмислена класификация.

Валидиран метод за изпитване: Метод за изпитване, за който са извършени валидиращи изследвания за определяне на приложимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод за изпитване може да не притежава достатъчно функционални характеристики по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел.

Оценяване на значимостта на данните: Процесът на отчитане на силните и слаби страни на различни видове информация за достигане до и в подкрепа на дадено заключение относно потенциалната опасност на едно вещество.

Допълнение 2

ОПИТНИ ХИМИКАЛИ ЗА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИПО

Преди редовно използване на метод за изпитване, който се основава на настоящия метод за изпитване, лабораториите могат да докажат техническа компетентност като правилно определят класификацията за корозивно действие върху очите за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1. Тези вещества са подбрани като представителни за редица реакции на локално дразнещо/корозивно действие върху окото, въз основа на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (TG 405) (т.е. Категории 1, 2А, 2В, или Некласифицирано и неетикетирано съгласно глобалната система на ОН GHS)(3)(7). От друга страна, предвид валидираното предназначение на тези анализи (т.е. за определяне само на вещества с корозивно/ силно дразнещо действие върху очите), съществуват само два възможни тестови резултата за целите на класифицирането, с които да се докаже компетентност (вещества с корозивно/силно дразнещо действие или вещества без корозивно/силно дразнещо действие. Други критерии, които бяха използвани за подбор на посочените вещества са: наличието на веществата на пазара, съществуването на висококачествени *in vivo* еталонни данни и съществуването на висококачествени данни от двата метода *in vitro*, за които се разработва Ръководство за изпитване. Поради тази причина веществата с дразнещо действие са подбрани от препоръчителния списък на ICCVAM с 122 еталонни вещества за валидиране на *in vitro* методи за изпитване на токсичност върху очите (вж. Допълнение Н: Списък на препоръчителни еталонни вещества на ICCVAM)(4). Еталонните данни са дадени в документацията на ICCVAM за метода за изпитване за непрозрачност и пропускливост на говежда роговица (НППР) и метода с ИПО (18) (19).

Таблица 1

Препоръчвани вещества за доказване на техническа опитност по отношение на метода ИПО

Химикал	CASRN	Химичен клас (1)	Физична форма	<i>In Vivo</i> Класификация (2)	<i>In Vitro</i> Класификация (2)
Бензалкониев хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониевое съединение	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Хлорхексидин	55-56-1	Амин, амидин	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Дибензоил-L-винена киселина	2743-38-6	Карбоксилна киселина, естер	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Имидазол	288-32-4	Хетероциклен	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
Трихлороацетилова киселина (30 %)	76-03-9	Карбонова киселина	Течност	Категория 1	Вещество с корозивно/ силно дразнещо действие
2,6-Дихлоробензоил хлорид	4659-45-4	Киселинен халид	Течност	Категория 2А	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
Етил-2-метил ацетоацетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2В	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо вещество	Категория 2А	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
Глицерин	56-81-5	Алкохол	Течност	Неетикетиран	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие
n-Хексан	110-54-3	Въглеродород (ацикличен)	Течност	Неетикетиран	Вещество без корозивно/ силно дразнещо действие

Съкращения: CASRN = Номер по регистъра на справочната служба по химикали

(1) За всяко изпитвано вещество е определен химичен клас, като за целта се използва стандартна схема за класификация, базираща се на системата за класификация MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (на разположение на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(2) Базира се на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (ОИСП TG 405) и се използва глобалната система GHS на ОН (3)(7).

(3) Базира се на резултати от изпитване за НППР и ИПО.

Допълнение 3

Схеми на обливащ апарат за ИПО и скоби за очи

(Вж. Burton et al. (17) за допълнителни обширни описания на обливащия апарат и скобите за очи)

