

KOMISSION ASETUS (EU) N:o 1152/2010,**annettu 8 päivänä joulukuuta 2010,****testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen****(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)**

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/ETY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annettua Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006⁽¹⁾ ja erityisesti sen 13 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Komission asetuksessa (EY) N:o 440/2008⁽²⁾ vahvistetaan asetuksen (EY) N:o 1907/2006 soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät, joilla määritellään aineiden fyysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.
- (2) Asetusta (EY) N:o 440/2008 on syytä muuttaa OECD:n hiljattain vahvistamien kahden uuden silmä-ärsytystä koskevan *in vitro* -menetelmän sisällyttämiseksi asetukseen,

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 8 päivänä joulukuuta 2010.

jotta koetarkoituksiin käytettävien eläinten määrää voitaisiin vähentää kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelua koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 24 päivänä marraskuuta 1986 annetun neuvoston direktiivin 86/609/ETY⁽³⁾ mukaisesti. Sidosryhmiä on kuultu asiasta.

- (3) Asetusta (EY) N:o 440/2008 olisi sen vuoksi muutettava.
- (4) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Lisätään asetuksen (EY) N:o 440/2008 liitteessä olevaan B osaan luvut B.47 ja B.48 tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Komission puolesta

José Manuel BARROSO

Puheenjohtaja

⁽¹⁾ EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ EYVL L 358, 18.12.1986, s. 1.

LIITE

***B. 47. NAUDAN SARVEISKALVON SAMEUTEEN JA LÄPÄISEVYYTEEN PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI**

JOHDANTO

1. Naudan sarveiskalvon sameuteen ja läpäisevyyteen perustuva testimenetelmä (Bovine Corneal Opacity and Permeability, BCOP) on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin käyttää aineiden ja seosten luokitteluun silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi (1) (2) (3). Tätä testimenetelmää sovellettaessa määritellään vakavasti ärsyttävät aineet sellaisiksi, jotka aiheuttavat silmävaurioita, jotka kestävät kanissa vähintään 21 vuorokautta annostelun jälkeen. Vaikka BCOP-testin ei katsota täysin korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä, sen käyttöä suositellaan vaiheittaisessa testauksessa sääntömääräistä luokitusta ja merkintöjen määrittämistä varten tietyllä sovellusalalla (4) (5). Testiaineet ja seokset (6) voidaan luokitella silmää syövyttäviksi tai silmää vakavasti ärsyttäviksi ilman kaneilla tehtävää lisätestausta. Aine, jolle saadaan testissä negatiivinen tulos, olisi testattava kaneissa käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa, kuten OECD:n ohjeessa Test Guideline 405 (7) (tämän liitteen B. 5 luku) esitetään.
2. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testiaineen mahdollinen kyky syövyttää tai ärsyttää vakavasti silmää mittaamalla kykyä aiheuttaa sameutta ja läpäisevyyden lisääntymistä eristetyssä naudan sarveiskalvossa. Myrkylliset vaikutukset sarveiskalvoon mitataan seuraavilla menetelmillä: i) valon läpikulun (transmission) vähentyminen (sameus) ja ii) natriumfluoreseiini-väriaineen lisääntynyt siirtyminen silmään (läpäisevyys). Testiaineelle altistuksen jälkeen tehdyt sarveiskalvon sameus- ja läpäisevyysarviointeja tarkastellaan yhdessä siten, että voidaan johtaa *in vitro* -ärsyttävyyssarvo (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS), jonka avulla luokitellaan testiaineen ärsyttävyytensä.
3. BCOP-menetelmällä on testattu myös silmää ärsyttäviä aineita, jotka aiheuttavat alle 21 päivässä palautuvia vaurioita ja aineita, jotka eivät ärsytä silmää. BCOP-menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta näihin kategorioihin kuuluvien aineiden testauksessa ei ole kuitenkaan validoitu virallisesti.
4. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA HUOMIOITA JA RAJOITUKSIA

5. Tämä testimenetelmä perustuu ICCVAMin (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinaatioikitea) BCOP-testimenetelmäprotokollaan (8), joka kehitettiin kansainvälisen validointitutkimuksen perusteella (4)(5)(9). Siihen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus ECVAM ja Japanin vastaava keskus (JaCVAM). Protokolla perustuu tietoihin, jotka on saatu *In vitro* -tieteiden instituutista (IIVS) ja INVITTOX-protokollasta 124 (10), joka edustaa protokollaa, jota käytettiin Euroopan yhteisön tukemassa vuosina 1997–1998 tehdyssä BCOP-testin esivalidointitutkimuksessa. Molemmat protokollat perustuvat BCOP-määrittämissä, jonka raportoivat ensimmäisenä Gautheron *et al.* (11).
6. Tämän testimenetelmän haittoja ovat validointitietokannassa havaitut alkoholeille ja ketoneille saatujen väärin positiivisten tulosten suuri määrä ja kiinteille aineille saatujen väärin negatiivisten tulosten suuri määrä (ks. kohta 44) (5). Kun tietokannasta poistetaan näihin kemiallisiin ja fysikaalisiin luokkiin kuuluvat aineet, parantuu BCOP-menetelmän tarkkuus EU:n, EPAn ja GHS:n luokitusjärjestelmissä huomattavasti (5). Koska tämän testin tarkoituksena on ainoastaan tunnistaa silmiä syövyttävät ja/tai silmiä vakavasti ärsyttävät aineet, väärät negatiiviset tulokset eivät haittaa, koska tällaiset aineet testattaisiin myöhemmin kaneilla tai muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. Nykyisen validointitietokannan avulla ei myöskään voida arvioida asianmukaisesti tiettyjä kemikaali- tai tuoteluokkia (esimerkiksi seoksia). Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikenlaisille testimateriaaleille, myös seoksille, jolloin positiivisen tuloksen voitaisiin katsoa viittaavan silmän syövytykseen tai vakavaan ärsytykseen. Alkoholeilla ja ketoneilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuitenkin suhtauduttava varovaisesti.
7. Kaikissa naudan silmiä ja sarveiskalvoja käytävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määrittämiä eläinperäisten materiaalien (muun muassa muttei ainoastaan kudosten ja kudosten) käsittelyä koskevia sääntöjä. Suositellaan yleismaailmallisia laboratorioissa noudatettavia ennalta varautumiskäytänteitä (12).
8. Eräs tämän testimenetelmän rajoitus on se, että vaikka siinä otetaan huomioon joitakin kanin silmä-ärsytystestissä arvioituja silmävaikutuksia ja jossain määrin niiden vakavuus, siinä ei tarkastella sidekalvon ja värikalvon vaurioita. Kaninsilmätutkimusten perusteella on myös ehdotettu, että vaikka BCOP-testissä ei sinänsä voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta, voidaan kuitenkin arvioida sarveiskalvovaurion alkuvuosityyppiä ja sen avulla erottaa palautuvat ja palautumattomat vaikutukset (13). BCOP-menetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä myrkyllisyyttä.

9. Tutkimuksissa pyritään selvittämään lisää BCOP-määrityksen käyttökelpoisuutta ja rajoituksia ei-vakavien ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi (ks. myös kohta 45). Käyttäjää rohkaistaan antamaan näytteitä ja/tai tuloksia validointijärjestöille, jotta BCOP-testimenetelmän mahdollisia tulevia käyttötapoja, kuten ei-vakavien ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistusta, voidaan arvioida virallisesti.
10. Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 2 mainittuja pätevyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä BCOP-testin suorituksessa ennen kuin se toimittaa BCOP-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

11. BCOP-testimenetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa naudan sarveiskalvon tavanomaisten fysiologisten ja biokemiallisten toimintojen lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro* -oloissa. Testiaineen aiheuttamaa vauriota arvioidaan tässä menetelmässä mittaamalla muutokset sarveiskalvon sameudessa ns. opasitometrillä ja muutokset läpäisevyydessä näkyvää valoa mittaavalla spektrofotometrillä. Molempia mittauksia käytetään IVIS-arvon laskemiseen. IVIS-arvon avulla osoitetaan aineelle *in vitro* -ärsyttävyyteen perustuva vaaraluokituskategoria, jotta voidaan ennustaa testiaineen *in vivo* -silma-ärsytyskyky (ks. päätöskriteerit).
12. BCOP-testimenetelmässä käytetään vasta teurastetuista naudoista saaduista silmistä eristettyjä sarveiskalvoja. Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy koko sarveiskalvon läpi ja joka mitataan takakammiossa olevassa mediumissa (väliaineessa). Testiaineet annostellaan sarveiskalvon epiteelipinnalle lisäämällä sitä sarveiskalvotelineen etukammioon. Lisäyksessä 3 on kuvaus ja kaavio BCOP-testissä käytetystä sarveiskalvotelineestä. Sarveiskalvotelineitä saa kaupallisesti eri lähteistä, tai ne voi rakentaa itse.

Naudan silmien lähde ja eläinten ikä sekä eläinlajin valinta

13. Teurastamoihin tuodut nautaeläimet teurastetaan useimmiten käytettäväksi ihmisravinnoksi tai muihin kaupallisiin tarkoituksiin. BCOP-testiin voidaan käyttää vain sarveiskalvoja, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä. Koska nautaeläinten paino vaihtelee paljon riippuen rodusta, iästä ja sukupuolesta, ei anneta mitään suositusta siitä, minkä painoisia eläinten olisi oltava teurastushetkellä.
14. Sarveiskalvojen mitat voivat vaihdella käytettäessä eri ikäisistä eläimistä saatuja silmiä. Yli kahdeksan vuoden ikäisistä eläimistä saatujen sarveiskalvojen halkaisija vaaka-suunnassa on yleensä $> 30,5$ mm ja sarveiskalvon keskiosan paksuus (CCT) $\geq 1\ 100$ μm , kun taas alle viiden vuoden ikäisten sarveiskalvon halkaisija on $< 28,5$ mm ja CCT < 900 μm . Tästä syystä ei yleensä käytetä silmiä, jotka on saatu yli 60 kuukauden ikäisistä eläimistä. Perinteisesti ei ole käytetty alle 12 kuukauden ikäisten nautojen silmiä, koska silmien kehitys on vielä kesken ja sarveiskalvo on huomattavasti ohuempi ja sen halkaisija pienempi kuin täysikasvuisten eläinten sarveiskalvon. Nuorista eläimistä (eli 6–12 kuukautta vanhoista) saatuja sarveiskalvoja voidaan käyttää, koska siihen liittyy joitakin etuja. Niitä saa helpommin, ikävaihtelu on pienempi, ja vaara työnteekijöiden altistumisesta naudan spongiformiselle enkefalopatialle on pienempi (15). Koska olisi hyödyllistä arvioida lisää sarveiskalvon koon tai paksuuden vaikutusta sarveiskalvon reagoimiseen syövyttäviin ja ärsyttäviin aineisiin, käyttäjiä kehoitetaan raportoimaan niiden eläinten arvioitu ikä ja/tai paino, joista tutkimuksessa käytetyt sarveiskalvot on saatu.

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

15. Teurastamon henkilökunta kerää silmät. Jotta silmille aiheutuisi mahdollisimman vähän mekaanista tai muuta vahinkoa, olisi silmämuna poistettava mahdollisimman pian kuoleman jälkeen. Jotta silmät eivät altistuisi mahdollisesti ärsyttävälle aineelle, teurastamon työnteekijät eivät saisi käyttää detergentejä huuhtoessaan eläimen päätä.
16. Silmät olisi upotettava kokonaan Hanksin suolaliuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) sopivankokoisessa astiassa ja kuljetettava laboratorioon sellaisella tavalla, että bakteerikontaminaatio tai muut vauriot ovat mahdollisimman pieniä. Koska silmät kerätään teurastuksen yhteydessä, niihin saattaa roiskua verta ja muita biologisia aineita, kuten bakteereja ja muita pieneliöitä. Siksi on tärkeää varmistaa, että kontaminaatoriski on mahdollisimman pieni. Esimerkiksi astia, jossa silmät ovat, on pidettävä jäähauteessa, ja kuljetusta varten käytettävään HBSS:ään on lisättävä antibiootteja (esim. penisilliiniä 100 IU/ml ja streptomysiiniä 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
17. Silmien keräämisen ja BCOP-testin tekemisen välisen ajan pitäisi olla mahdollisimman lyhyt (keräys ja käyttö mie-luiten samana päivänä), ja pitäisi osoittaa, etteivät määritystulokset ole sen takia epäluotettavia. Nämä tulokset perustuvat silmien valintaperusteisiin sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden vasteisiin. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta tietynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

BCOP-testissä käytettävien silmien valintaperusteet

18. Heti kun silmät saapuvat laboratorioon, tutkitaan huolellisesti, onko niissä vikoja, kuten lisääntynyttä sameutta, naarmuja ja verisuonittumista. Testissä saa käyttää vain sellaisista silmistä saatuja sarveiskalvoja, joissa ei ole tällaisia vikoja.
19. Kaikkien sarveiskalvojen laatua arvioidaan myös määrittämisen myöhemmissä vaiheissa. Sarveiskalvot, joiden sameusaste yhden tunnin tasapainottumisajan jälkeen on suurempi kuin seitsemän sameusyksikköä (HUOM. opasitometri pitäisi kalibroida sameusyksikköjen vahvistamiseen käytetyillä sameusstandardeilla, ks. lisäys 3), hylätään.
20. Kussakin käsittelyryhmässä (testiaine, samaan aikaan tehtävät negatiiviset ja positiiviset kontrollit) on oltava vähintään kolme silmää. BCOP-määrittämisessä pitäisi negatiiviseen kontrolliin käyttää kolme sarveiskalvoa. Koska kaikki sarveiskalvot leikataan kokonaisuudesta silmämunasta ja asetetaan sarveiskalvokammioihin, voi käsittelystä aiheutua vahinkoa, joka vaikuttaa yksittäisen sarveiskalvon sameuteen ja läpäisevyyteen (myös negatiivisissa kontrollissa). Negatiivisista kontrollisarveiskalvoista saatuja sameus- ja läpäisevyysarvoja käytetään lisäksi IVIS-laskelmissa korjaamaan testituotteella ja positiivisella kontrollilla käsiteltyjen sarveiskalvojen sameus- ja läpäisevyysarvoja.

MENETTELY**Silmien valmistelu**

21. Virheettömät sarveiskalvot leikataan siten, että niihin jää 2–3 mm:n reuna kovakalvoa, mikä helpottaa myöhempää käsittelyä. Varotaan vahingoittamasta sarveiskalvon epiteeliä ja endoteeliä. Eristetyt sarveiskalvot asetetaan erikoistelineisiin, joissa on etu- ja takaosasto. Nämä ovat kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuoleen (etukammio) ja endoteelipuoleen (takakammio). Molemmat kammiot täytetään ylimäärin esilämmitetyllä Eaglen Minimum Essential Medium (EMEM) -viljelyneesteellä (mediumilla) (takakammio ensin) ja varmistetaan, ettei muodostu kuplia. Laitteen annetaan tasapainottua 32 ± 1 celsiusasteessa vähintään tunnin, jotta sarveiskalvot tasapainottuvat mediumin kanssa ja niiden metabolinen toiminta palautuu normaaliksi (mikäli mahdollista). Sarveiskalvon pinnan lämpötila *in vivo* on noin 32°C .
22. Tasapainottumisjakson jälkeen molempiin kammioiden lisätään tuoretta esilämmitettyä EMEM:iä, ja kustakin sarveiskalvosta otetaan sameuden perustasolukema. Kaikki sarveiskalvot, joissa esiintyy makroskooppisia kudosvaurioita (esimerkiksi naarmuja, värjäilyä, verisuonittumista) tai joiden sameus ylittää 7 sameusyksikköä, hylätään. Kaikille tasapainotetuille sarveiskalvoille lasketaan sameuden keskiarvo. Negatiivisiksi kontrollisarveiskalvoiksi (liuotinkontrolli) valitaan vähintään kolme sarveiskalvoa, joiden sameusarvot ovat lähellä kaikkien sarveiskalvojen mediaania. Muut sarveiskalvot jaetaan käsittelyryhmään ja positiivisen kontrollin ryhmään.
23. Koska veden lämpökapasiteetti on suurempi kuin ilman, vedellä saadaan tasaisempi inkubaatiolämpötila. Siksi suositellaan vesihauteen käyttöä sarveiskalvotelineen ja sen sisällön pitämiseksi 32 ± 1 celsiusasteessa. Kuitenkin myös ilmainkubaattoreita voidaan käyttää, kunhan huolehditaan siihen, että lämpötila pysyy vakaana (esimerkiksi esilämmitämällä telineet ja mediumit).

Testiaineen annostelu

24. Käsittelyä varten on kaksi eri protokollaa, toinen nesteille ja pinta-aktiivisille aineille (kiinteät tai nestemäiset) ja toinen kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia.
25. Nesteet testataan laimentamattomina. Pinta-aktiiviset aineet testataan 10-prosenttisen liuoksena (w/v) 0,9-prosenttisesti natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuotuksessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Puoliksi kiinteät aineet, voiteet ja vahat testataan tavallisesti kuten nesteet. Jos laimennuksia muutetaan, on ne perusteltava. Sarveiskalvot altistetaan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille 10 minuutin ajan. Jos altistusajaa muutetaan, olisi se perusteltava tieteellisesti.
26. Kiinteät aineet, jotka eivät ole pinta-aktiivisia, testataan tavallisesti 20-prosenttisena liuoksena tai suspensiona 0,9-prosenttisesti natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuotuksessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Joissakin olosuhteissa ja asianmukaisesti tieteellisesti perusteltuna kiinteitä aineita voidaan testata myös sellaisenaan annostelemalla niitä suoraan sarveiskalvon pinnalle avoimen kammion menetelmässä (ks. kohta 29). Sarveiskalvot altistetaan kiinteille aineille neljän tunnin ajan. Kuten nesteiden ja pinta-aktiivisten aineiden tapauksessa, altistusajan muuttaminen on perusteltava tieteellisesti.
27. Käsittely voi olla erilaista riippuen testattavan aineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista, esimerkiksi siitä, onko kyseessä kiinteä aine, neste, viskoosi tai ei-viskoosi neste. Tärkeintä on varmistaa, että testiaine peittää riittävästi epiteelin pinnan ja että se voidaan huuhtelemalla poistaa riittävästi. Suljetun kammion menetelmää käytetään tavallisesti testattaville nesteille, jotka vaihtelevat ei-viskoosista lievästi viskoosiin, kun taas avoimen kammion menetelmää käytetään tavallisesti puoliksi viskoosille ja viskoosille nesteille ja kiinteille aineille.

28. Suljetun kammion menetelmässä annostellaan etukammioon niin paljon testiainetta (750 µl), että se peittää sarveiskalvon epiteelipuolen. Annostelu tapahtuu kammion yläosassa olevien aukkojen kautta. Aukot suljetaan sitten tulpilla altistuksen ajaksi. On tärkeää varmistaa, että kukin sarveiskalvo altistetaan testiaineelle niin pitkäksi aikaa kuin on asianmukaista.
29. Avoimen kammion menetelmässä ikkunan lukitusrenas ja etukammion lasi-ikkuna poistetaan ennen käsittelyä. Kontrollia tai testiainetta (750 µl tai niin paljon, että testiaine peittää sarveiskalvon kokonaan) annostellaan suoraan sarveiskalvon epiteelipinnalle mikropipetillä. Jos testiainetta on vaikea pipetoida, se voidaan siirtää paineen avulla ns. positive displacement -pipetointilaitteeseen annostelun helpottamiseksi. Positive displacement -pipetin kärki työnnetään ruiskun annostelukärkeen niin, että aine voidaan siirtää displacement-pipetin kärkeen paineen avulla. Ruiskun mäntää painetaan samalla kun pipetin mäntää vedetään ylöspäin. Jos pipetin kärkeen ilmestyy ilmapuolia, testiaine puhalletaan ulos ja prosessi toistetaan, kunnes kärki saadaan täytettyä ilman ilmapuolia. Jos on tarpeen, voidaan käyttää tavallista ruiskua (ilman neulaa), koska sillä voidaan mitata tarkka tilavuus testiainetta, ja annostelu sarveiskalvon epiteelipinnalle on helpompaa. Annostelun jälkeen lasi-ikkuna pannaan paikalleen etukammion päälle, jotta järjestelmä on jälleen suljettu.

Inkubointi altistuksen jälkeen

30. Altistusajan jälkeen testiaine, negatiivinen kontrolliaine tai positiivinen kontrolliaine poistetaan etukammion epiteeli pestään vähintään kolmesti (tai kunnes testiainetta ei näy) EMEM:illä (jossa on fenolipunaa). Huuhteluun käytetään fenolipunaa sisältävää mediumia, koska fenolipunan värin vaihtumista voidaan seurata, kun halutaan määrittää happamien tai emäksisten aineiden huuhtelun tehokkuus. Sarveiskalvoja pestään enemmän kuin kolme kertaa, jos fenolipuna on edelleen vääränvärinen (keltainen tai purppuranvärinen) tai jos testiainetta on vielä näkyvillä. Kun mediumissa ei ole enää testiainetta, sarveiskalvot pestään vielä kerran EMEM:illä (jossa ei ole fenolipunaa). EMEM-huuhtelua (ilman fenolipunaa) käytetään viimeiseksi sen varmistamiseksi, että fenolipuna on poistunut etukammion ennen sameusmittausta. Etukammio täytetään sitten uudelleen tuoreella EMEM:illä (ilman fenolipunaa).
31. Kun testiaine on neste tai pinta-aktiivinen aine, sarveiskalvoja inkuboidaan huuhtelun jälkeen vielä kaksi tuntia 32 ± 1 celsiusasteessa. Tietyissä olosuhteissa voi pitempi aika altistuksen jälkeen olla hyödyksi. Sitä voidaan harkita tapauskohtaisesti. Kiinteillä aineilla käsitellyt sarveiskalvot huuhdellaan perusteellisesti neljän tunnin altistuksen päätteeksi, mutta niitä ei tarvitse enää inkuboida enempää.
32. Kunkin sarveiskalvon sameus ja läpäisevyys kirjataan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille altistuksen jälkeisen inkubaation jälkeen ja kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia aineita, neljän tunnin altistuksen jälkeen. Kutakin sarveiskalvoa tarkastellaan myös silmämääräisesti ja kirjataan merkitykselliset havainnot (esimerkiksi kudoksen kuoriutuminen, testiaineen jäämät, epätasainen sameusjakauma). Tällaiset havainnot voivat olla tärkeitä, sillä ne voivat näkyä opasitometrin lukemien vaihteluna.

Kontrolliaineet

33. Kussakin kokeessa on mukana samanaikaisesti määritettävät negatiiviset eli liuotin/vehikkelikontrollit ja positiiviset kontrollit.
34. Kun testataan 100-prosenttista nestemäistä ainetta, otetaan BCOP-määrittämiseen samanaikaisesti määritettävä negatiivinen kontrolli (esimerkiksi 0,9-prosenttinen natriumkloridiliuos tai tislattu vesi) sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrittämisen päätepisteille saadaan perustaso. Näin varmistetaan myös, etteivät määrittämissuhteet aiheuta ärsytysvastetta tahattomasti.
35. Kun testataan laimennettua nestettä, pinta-aktiivista ainetta tai kiinteää ainetta, otetaan BCOP-määrittämiseen samanaikaisesti määritettävä liuotin/vehikkelikontrolliryhmä sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrittämisen päätepisteille saadaan perustaso. Liuotinta/vehikkeliä saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.
36. Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan tunnettu silmiä ärsyttävä aine positiivisena kontrollina, jotta voidaan varmistaa, että saadaan asianmukainen vaste. Koska BCOP-määrittämistä käytetään tässä testimenetelmässä syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi, positiivisen kontrollin olisi mielellään oltava aine, joka aiheuttaa vakavan vasteen tässä testimenetelmässä. Ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan määrittää.
37. Nestemäisille testiaineille voidaan positiivisena kontrollina käyttää esimerkiksi dimetyyliformamidia tai 1-prosenttista natriumhydroksidia. Kiinteiden testiaineiden positiivisena kontrollina voidaan käyttää esimerkiksi 20-prosenttista (w/v) imidatsolia 0,9-prosenttisesti natriumkloridiliuoksessa.

38. Vertailuaineet ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepiestet

39. Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Sarveiskalvon sameus mitataan kvantitatiivisesti opasitometrillä, jolla saadaan jatkuvalla asteikolla mitattuja sameusarvoja.
40. Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy kaikkien sarveiskalvon solukerrosten (ts. sarveiskalvon ulkopinnan epiteelin ja sisäpinnan endoteelin) läpi. 1 ml natriumfluoreseiiniliuosta (4 mg/ml testattaessa nesteitä tai pinta-aktiivisia aineita tai 5 mg/ml testattaessa kiinteitä aineita, jotka eivät ole pinta-aktiivisia) lisätään sarveiskalvotelineen etukammioon, joka on kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuolen kanssa. Takakammiossa, joka on kosketuksissa sarveiskalvon endoteelipuolen kanssa, on tuoretta EMEM:iä. Telinettä inkuboidaan vaakasuorassa 90 ± 5 min 32 ± 1 celsiusasteessa. Takakammioon siirtyvän natriumfluoreseiinin määrä mitataan UV/VIS-spektrofotometrillä. 490 nanometrin aallonpituudella mitatut spektrofotometrin lukemat kirjataan optisena tiheytenä (OD_{490}) tai absorbanssiarvoina, jotka mitataan jatkuvalla asteikolla. Fluoreseiiniläpäisevyysarvot määritetään käyttäen OD_{490} -arvoja, jotka on mitattu spektrofotometrillä tavanomaisella 1 senttimetrin valotiellä.
41. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää 96 kuopan kuoppalevyjen lukulaitetta, jos i) laitteen fluoreseiinin OD_{490} -arvojen mittausalue on lineaarinen; ja ii) 96 kuopan levyissä käytetään sellaista fluoreseiininäytteiden tilavuutta, jolla saadaan 1 cm:n valotiellä saatuja arvoja vastaavat OD_{490} -arvot (tämä saattaa edellyttää, että kuoppa täytetään kokonaan [tavallisesti 360ml]).

MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET

Mittaustulosten arviointi

42. Kun sameusarvot ja keskimääräiset läpäisevyysarvot (OD_{490}) on korjattu taustan sameuden ja negatiivisen kontrollin läpäisevyyden OD_{490} -arvojen suhteen, yhdistetään kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskimääräiset OD_{490} -arvot kokemukseräiseen kaavaan, josta lasketaan kullekin käsittelyryhmälle *in vitro*-ärsytysaste (IVIS) seuraavasti:

$$IVIS = \text{sameuden keskiarvo} + (15 \times \text{keskimääräinen läpäisevyys } OD_{490} \text{-arvo})$$

Sina *et al.* (16) ovat raportoineet, että tämä kaava on johdettu heidän laboratoriossaan ja laboratoriodenvälisissä tutkimuksissa. Monilaboratoriotutkimuksessa 36 yhdisteen sarjalle saaduille tuloksille tehtiin monimuuttuja-analyysi, jossa määritettiin paras yhtälö *in vivo* ja *in vitro* saatujen tuloksien välille. Kahden yhtiön tutkijat tekivät tämän analyysin. He johtivat lähes identtiset yhtälöt.

43. Sameus- ja läpäisevyysarvoja olisi arvioitava myös erikseen, jotta nähdään, aiheuttaako testiaine syövytystä tai vakavaa ärsytystä vain yhden päätepiesteen määrittämisessä (ks. päätöskriteerit).

Päätöskriteerit

44. Aine, jonka aiheuttama IVIS on vähintään 55,1, määritellään syövyttäväksi tai vakavaa ärsytystä aiheuttavaksi aineeksi. Kuten 1 kohdassa mainittiin, jos testiainetta ei tunnusteta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi, on testausta jatkettava luokitusta ja merkintöjen määrittämistä varten. BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on välillä 79 % (113/143) – 81 % (119/147), siinä saatujen väriiden positiivisten tulosten määrä on välillä 19 % (20/103) – 21 % (22/103) ja väriiden negatiivisten tulosten määrä välillä 16 % (7/43) – 25 % (10/40) verrattuna kanin silmää *in vivo* käyttävällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin luokiteltuna EPAn (1), EU:n (2) tai GHS:n (3) luokitusjärjestelmien mukaan. Kun tietokannasta jätetään pois tiettyihin kemiallisiin (alkoholit, ketonit) tai fysikaalisiin (kiinteät aineet) luokkiin kuuluvat aineet, BCOP-menettelmän tarkkuus EPAn, EU:n ja GHS:n luokitusjärjestelmissä vaihtelee välillä 87 % (72/83) – 92 % (78/85), väriiden positiivisten tulosten määrä on välillä 12 % (7/58) – 16 % (9/56) ja väriiden negatiivisten tulosten määrä välillä 0 % (0/27) – 12 % (3/26).
45. Vaikka testiaineelle ei saataisi luokitusta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi aineeksi, BCOP-menettelmässä saaduista tuloksista voi olla hyötyä käytettynä yhdessä *in vivo*-kaninsilmätestissä tai asianmukaisesti validoidussa *in vitro*-testissä saatujen testitulosten kanssa, kun arvioidaan BCOP-menettelmän käyttökelpoisuutta ja rajoituksia muiden kuin vakavasti ärsyttävien ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamisessa (valmisteilla on ohjeet *in vitro*-silmämyrkyllisyystestimenetelmien käytöstä).

Tutkimuksen hyväksymiskriteerit

46. Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos positiivisella kontrollilla saadaan IVIS-arvo, joka on kahden standardipoikkeaman sisällä senhetkisestä pitkän aikavälin keskiarvosta, joka on päivitettävä vähintään kolmen kuukauden välein tai joka kerta kun sellaisissa laboratorioissa, joissa testejä tehdään vain harvoin (vähemmän kuin kerran kuussa) saadaan hyväksyty testi. Negatiivisista tai liuotin/vehikkelivasteista saatujen sameus- ja läpäisevyysarvojen pitäisi olla pienemmät kuin vahvistetut sameuden ja läpäisevyyden taustaraja-arvot naudan sarveiskalvolle, jota on käsitelty negatiivisilla tai liuotin/vehikkelikontrolleilla.

Testiseloste

47. Testiselosteessa olisi annettava seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorittamiselle:

Testi- ja kontrolliaineet

Kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan;

CAS-numero, jos se tunnetaan;

Aineen tai seoksen puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla;

Testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus;

Tarvittaessa testi- ja/tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen);

Stabiilius, jos se tiedetään.

Sponsorin ja testauslaitosta koskevat tiedot:

Sponsorin nimi ja osoite, testilaitos ja tutkimusjohtaja;

Silmien lähde (laitos, josta ne on kerätty);

Silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten silmien keräyspäivä ja kellonaika, aika siihen asti kun testi aloitettiin, kuljetuksessa käytetty medium ja lämpötilaolot, mahdollisesti käytetyt antibiootit);

Erytyistietoja eläimistä, joista silmät on kerätty (kuten ikä, sukupuoli, paino), jos tiedot ovat saatavilla.

*Käytetyn testimenetelmän ja protokollan perustelu**Testimenetelmän integriteetti*

Menettely, jolla testimenetelmän integriteetti (ts. tarkkuus ja luotettavuus) ajan suhteen varmistetaan (esimerkiksi pätevöittämiseen käytettyjen aineiden säännöllinen testaus, aiempien negatiivisten ja positiivisten kontrollitulosten käyttö).

Hyväksyttävän testin kriteerit

Hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit;

Tapauksen mukaan hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit.

Testausolosuhteet

Kuvaus käytetystä testijärjestelmästä;

Käytetyn sarveiskalvotelineen tyyppi;

Kalibrointitiedot laitteista, joita käytettiin sameuden ja läpäisevyyden mittaukseen (esimerkiksi opasimetri ja spektrofotometri);

Käytettyjä naudan silmiä koskevat tiedot, myös niiden laatua koskeva lausuma:

Käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti;

Käytetyt testiainekonsentraatit;

Kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista;

Viittaus mallia koskeviin aiempiin tuloksiin (esimerkiksi negatiiviset ja positiiviset kontrollit, pätevyttämiseen käytetyt aineet, vertailuaineet);

Kuvaus käytetyistä arviointikriteereistä.

Tulokset

Esitetään taulukossa tulokset, jotka on saatu yksittäisistä testinäytteistä (esimerkiksi sameus ja OD₄₉₀ -arvot ja lasketut IVIS-arvot testiaineelle sekä positiivisille, negatiivisille ja vertailukontrolleille [jos mukana] taulukkomuodossa, myös tulokset toistetuista kaksoismäärytyksistä tapauksen mukaan, sekä keskiarvot ± standardipoikkeamat kullekin kokeelle;

Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmä

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (3) YK (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm]
- (6) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/ETY ja 2000/21/EY kumoamisesta. EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[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 Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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, Italia: 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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [<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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuudella mitataan testimenetelmän suoritusta, ja se on eräs ”relevanssin” näkökohta. Termiä käytetään usein ”konkordanssin” kanssa vaihtoehtoisena, jolloin sillä tarkoitetaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Vertailuaine: Aine, johon testiainetta verrataan. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) se saadaan vakaana pysyvänä ja luotettavasta lähteestä; ii) sen rakenne ja toiminta ovat samankaltaisia testattavan aineryhmän kanssa; iii) sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tunnetaan; iv) se tukee tunnetuista vaikutuksista saatuja tietoja, ja v) sen vaikutuskyky halutun vasteen vaihtelualueella tunnetaan.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota. Sameus voidaan arvioida subjektiivisesti Draizen kaninsilmätestillä tai objektiivisesti jollain laitteella, kuten "opasitometrillä".

Sarveiskalvon läpäisevyys: Sarveiskalvon epiteelin vaurion mitta, jota varten määritetään kaikkien sarveiskalvon solukerrostensa läpi menneen fluoreseiini-väriaineen määrä.

EPA-kategoria 1: Syövyttävä (palautumaton silmäkudoksen tuhoutuminen) tai yli 21 vuorokautta kestävä sarveiskalvoon kohdistuva vaikutus tai ärsytys (1).

EU:n R41-luokka: Silmän kudosaauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (2).

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa ehdotetaan kemikaalien (aineet ja seokset) luokitusta fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja osoitetaan niille vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten (mukaan luettuina työnantajat, työntekijät, kuljettajat, kuluttajat ja pelastushenkilöstö) ja ympäristön suojelemiseksi (3).

GHS-kategoria 1: Silmän kudosaauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (3).

Vaara: Vaikuttavan tekijän ("agentin") tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

In vitro ärsytysarvo (In Vitro Irritancy Score, IVIS): BCOP-testissä käytetty empiirisesti johdettu kaava, jossa kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskiarvot yhdistetään yhteen *in vitro* -arvoon. IVIS = sameuden keskiarvo + (15 x keskimääräinen läpäisevyysarvo)

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Ei-ärsyttävä: Aineet, joita ei ole luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan I, II tai III; EU:n kategoriaan R41 tai R36; tai GHS:n kategoriaan 1, 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Silmää syövyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosaauriota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPA:n kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäväksi aineiksi (1) (2) (3).

Silmää ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen, kun sitä on annosteltu silmän etupinnalle; b) aineet, jotka on luokiteltu EPA:n kategoriaan II tai III, EU:n kategoriaan R36 tai GHS:n kategoriaan 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineiksi (1) (2) (3).

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmän etupinnalle annosteltuna kudosaauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäviksi aineiksi (1) (2) (3).

Opasitometri: Laite, jolla mitataan sarveiskalvon sameutta arvioimalla kvantitatiivisesti valon kulkeminen sarveiskalvon läpi. Opasitometrissä on tyypillisesti kaksi osastoa, joista kussakin on oma valonlähde ja valokenno. Toista osastoa käytetään käsitellylle sarveiskalvolle ja toista laitteen kalibrointiin ja nollaamiseen. Halogeenilampun valoa lähetetään kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vakava vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Luotettavuus: Arvo, joka osoittaa, missä määrin testimenetelmä pystytään suorittamaan uusittavalla tavalla samassa laboratorioissa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratoriodenväläinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Liutin/vehikkelikontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai vehikkeli, ja joka prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testiaine on liuotettu samaan liuottimeen tai vehikkeliin. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai vehikkeli testijärjestelmän kanssa.

Vaiheittainen testaus: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testiainetta koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testiaineen ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätästä tarvita. Jos testiaineen ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määrittää aukottomasti.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka validointitutkimukset on saatettu päätökseen ja relevanssi (tarkkuus mukaan luettuna) ja luotettavuus tiettyä tarkoitusta varten on määritetty. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää aineen vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Lisäys 2

Pätevöittämiseen käytettävät aineet BCOP-testimenetelmälle

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiinomaisesti, se voi osoittaa teknisen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 10 aineen syövyttävyydenluokituksen. Aineet on valittu siten, että ne edustavat sellaisia paikallisen silmä-ärsytyksen ja/tai syövytyksen vasteita, jotka perustuvat *in vivo* kaninsilmätestissä (TG 405) saatuihin tuloksiin (ts. YK:n GHS-järjestelmän kategoriat 1, 2A, 2B tai "Ei luokiteltu ja merkitty") (3) (7). Kun otetaan huomioon näiden määritysten validoitu hyödyllisyys (ts. ainoastaan silmää syövyttävien ja/tai silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamista varten), vain kahta luokitustarkoituksiin käytettävää testitulosta (syövyttävät ja/tai silmää vakavasti ärsyttävät aineet tai ei-syövyttävät ja/tai ei vakavasti ärsyttävät aineet) käytetään pätevyuden osoittamiseksi. Muita valintakriteerejä ovat se, että aineet ovat kaupallisesti saatavilla, että saatavilla on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja ja että on laadukkaita tietoja niistä kahdesta *in vitro* -menetelmästä, joille parhaillaan kehitetään testiohjeita. Tästä syystä ärsyttävät aineet silmätoksisuuden *in vitro* -testimenetelmien validointiin valittiin ICCVAM:n 122 suositellun vertailuaineen luettelosta (ks. lisäys H): ICCVAM: suositellut vertailuaineet (5). Vertailutiedot ovat saatavilla BCOP-menetelmälle ja eristetyllä kanan silmällä tehtävälle testimenetelmälle (ICE) laadituista taustasiakirjoista (17) (18).

Taulukko 1

Suositellut aineet BCOP-menetelmän teknisen pätevyden osoittamiseksi

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto:	<i>In vivo</i> -luokitus (2)	<i>In vitro</i> -luokitus (3)
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Triklloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
2,6-Diklooribentsoylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Kategoria 2A	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
Etyyli-2-metyyliaseto-asettaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Kategoria 2B	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Kategoria 2A	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
n-Heksaani	110-54-3	Hiilivety (asyklinen)	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) Kunkin testiaineen kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (OECD TG 405) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (3)(7).

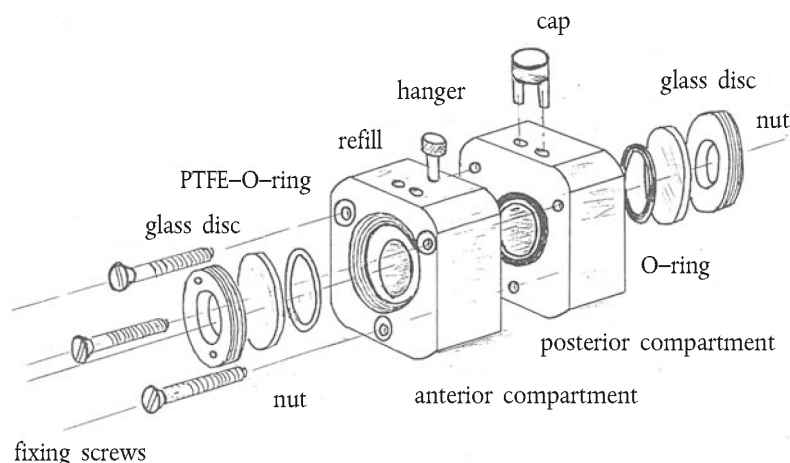
(3) Perustuu BCOP- ja ICE-testien tuloksiin.

Lisäys 3

BCOP-TESTISSÄ KÄYTETTY SARVEISKALVOTELINE

1. BCOP-testissä käytetyt sarveiskalvotelinet valmistetaan reagoimattomasta aineesta (esimerkiksi polypropyleenistä). Telineissä on kaksi puolta (etu- ja takakammio) ja kaksi samanlaista lieriömuotoista sisäkammiota. Kuhunkin kammioon mahtuu 5 ml:aa, ja niiden päässä on lasi-ikkuna, jonka läpi sameusmittaukset tehdään. Kunkin sisäkammion halkaisija on 1,7 cm ja syvyys 2,2 cm (1). Takakammiossa on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Sarveiskalvo asetetaan endoteelipuoli alaspäin takakammion tiivisterengaan päälle, ja etukammio asetetaan sarveiskalvon epiteelipuolen päälle. Kammiot kiinnitetään paikoilleen kolmella ruostumattomasta teräksestä valmistetulla ruuvilla, jotka sijaitsevat kammion ulkoreunoilla. Kunkin kammion päässä on lasi-ikkuna, joka voidaan poistaa, että sarveiskalvoon päästään helposti käsiksi. Lasi-ikkunan ja kammion välissä on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Medium ja testiyhdisteet lisätään kammioon (ja poistetaan siitä) niiden yläosassa olevien kahden aukon kautta. Aukot suljetaan kumitulpilla käsittelyn ja inkubaation ajaksi.

(1) Mitat ovat sarveiskalvotelinelle, jota käytetään 12–60 kuukauden ikäisille lehmille. Jos käytetään 6–12 kuukauden ikäisiä eläimiä, olisi teline suunniteltava niin, että kunkin kammion tilavuus on 4 ml ja kunkin sisäkammion halkaisija 1,5 cm ja syvyys 2,2 cm. Jos tehdään uusi, erilainen sarveiskalvoteline, on tärkeää huolehtia siitä, että altistetun sarveiskalvon pinta-alan suhde takakammion tilavuuteen on sama kuin käytettäessä tavanomaista sarveiskalvotelinettä. Tämä on välttämätöntä, jotta läpäisevyysarvot voidaan määrittää oikein IVIS-arvon laskemiseksi ehdotetulla kaavalla.



Sanasto

Glass disc: Lasikiekkö

PTFE-O-ring: PTFE-tiivisterengas

Refill: Täyttö

Hanger: Ripustinlaite

Cap: Tulppa

Nut: Mutteri

O-ring: Tiivisterengas

Posterior compartment: Takaosasto

Anterior compartment: Etuosasto

Fixing screws: Kiinnitysruuvit

OPASITOMETRI

- Opasitometri on laite, jolla mitataan valon transmissiota. Halogeenilampun valoa lähetetään kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo. Sameusyksiköt määritetään.
- Opasitometrillä pitäisi saada lineaarinen vaste sellaisella sameuslukema-alueella, joka kattaa ennustemallissa kuvatuille eri luokituksille käytetyt raja-arvot (ts. siihen arvoon saakka, joka määrittää syövyttävyyden ja/tai vakavan ärsyttävyyden). Jotta voidaan varmistaa, että lukemat ovat lineaarisia ja tarkkoja 75–80 sameusyksikköön saakka, on opasitometri kalibroitava sarjalla kalibraattoreita. Kalibraattorit (opaakit polyesterilevyt) asetetaan kalibrintikammioon (sarveiskalvokammio, joka on suunniteltu kalibraattoreiden käyttöä varten), ja opasitometrissä otetaan lukemat. Kalibrintikammio on suunniteltu sellaiseksi, että kalibraattorit ovat siinä suunnilleen samalla etäisyydellä valosta ja valokennosta kuin mihin sarveiskalvot asetettaisiin sameusmittausten ajaksi. Opasitometri kalibroidaan ensin 0 sameusyksikköön käyttäen kalibrintikammioita, jossa ei ole kalibraattoria. Kalibrintikammioon asetetaan sitten peräkkäin kolme erilaista kalibraattoria ja mitataan sameudet. Kalibraattoreilla 1, 2 ja 3 pitäisi saada 5 prosentin tarkkuudella samat sameuslukemat kuin asetetut arvot 75, 150 ja 225 sameusyksikköä.

B. 48. ERISTETTYÄ KANAN SILMÄÄ KÄYTTÄVÄ TESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI

JOHDANTO

1. Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä (Isolated Chicken Eye, ICE) on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin käyttää aineiden ja seosten luokitteluun silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi (1) (2) (3). Tätä testimenetelmää sovellettaessa määritellään vakavasti ärsyttävät aineet sellaisiksi, jotka aiheuttavat silmävaurioita, jotka kestävät kanissa vähintään 21 vuorokautta annostelun jälkeen. Vaikka ICE-testin ei katsota täysin korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä, sen käyttöä suositellaan vaiheittaisessa testauksessa sääntömääräistä luokitusta ja merkintöjen määrittämistä varten tietyllä sovellusalalla (4) (5). Testiaineita ja seoksia (6), jotka ovat tässä määrittämisessä positiivisia, voidaan luokitella silmää syövyttäviksi tai silmää vakavasti ärsyttäviksi ilman kaneilla tehtävää lisätästäusta. Aine, jolle saadaan testissä negatiivinen tulos, olisi testattava kaneissa käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa, kuten OECD:n ohjeessa Test Guideline 405 (7) (tämän liitteen B. 5 luku esitetään).
2. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testiaineen mahdollinen kyky syövyttää tai ärsyttää vakavasti silmää mittaamalla kykyä aiheuttaa myrkyllisyyttä eristetyssä kanan silmässä, josta silmämunan on poistettu. Sarveiskalvoon kohdistuneet myrkyllisyysvaikutukset mitataan i) määrittämällä sameus kvalitatiivisesti, ii) määrittämällä epiteelivaurio kvalitatiivisesti, kun silmään lisätään fluoreseiiniä (fluoreseiinin retentio), iii) mittaamalla kvantitatiivisesti paksuuntuminen (turpoaminen) ja iv) arvioimalla kvalitatiivisesti pinnan makroskooppiset morfologiset vauriot. Sarveiskalvon sameus, turpoaminen ja vaurio arvioidaan testiaineelle altistuksen jälkeen erikseen ja yhdistetään sen jälkeen, jotta voidaan johtaa silmä-ärsytysluokitus.
3. ICE-menetelmällä on testattu myös silmää ärsyttäviä aineita, jotka aiheuttavat alle 21 päivässä palautuvia vaurioita ja aineita, jotka eivät ärsytä silmää. ICE-menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta näihin kategorioihin kuuluvien aineiden testauksessa ei ole kuitenkaan validoitu virallisesti.
4. Määrittelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA HUOMIOITA JA RAJOITUKSIA

5. Tämä testimenetelmä perustuu ICCVAMin (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinaatioikomitea) ICE-testimenetelmäprotokollaan (8), joka kehitettiin kansainvälisen validointitutkimuksen perusteella (4)(5)(9). Tutkimukseen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus, Japanin vastaava keskus ja Alankomaiden sovelletun luonnontieteen tutkimuslaitoksen TNO toksikologian ja sovelletun farmakologian elämän laatu -osasto. Protokolla perustuu julkaistuihin protokollisiin ja TNO:n nykyisiin käyttämästä protokollista saatuihin tietoihin (10) (11) (12) (13) (14).
6. Tämän menetelmän tunnistettuja rajoituksia ovat alkoholeille saatujen väärin positiivisten tulosten määrä ja kiinteille aineille ja pinta-aktiivisille aineille saatujen väärin negatiivisten tulosten määrä (ks. kohta 47) (4). Kun tietokannasta poistetaan näihin kemiallisiin ja fysikaalisiin luokkiin kuuluvat aineet, parantuu ICE-menetelmän tarkkuus EU:n, EPAn ja GHS:n luokitusjärjestelmissä huomattavasti (4). Koska tämän testin tarkoituksena on ainoastaan tunnistaa silmiä syövyttävät ja/tai silmiä vakavasti ärsyttävät aineet, väärät negatiiviset tulokset eivät haittaa, koska tällaiset aineet testattaisiin myöhemmin kaneilla tai muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. Nykyisen validointitietokannan avulla ei myöskään voida arvioida asianmukaisesti tiettyjä kemikaali- tai tuoteluokkia (esimerkiksi seoksia). Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille testimateriaaleille, myös seoksille, jolloin positiivisen tuloksen voitaisiin katsoa viittaavan silmän syövytykseen tai vakavaan ärsytykseen. Alkoholeilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuitenkin suhtauduttava varovaisesti yliennustuksen vaaran takia.
7. Kaikissa kanan silmiä käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määrittämiä ihmis- tai eläinperäisten materiaalien (muun muassa muttei ainoastaan kudosten ja kudosten) käsittelyä koskevia sääntöjä ja menettelyjä. Suositellaan yleismaailmallisia laboratorioissa noudatettavia ennalta varautumiskäytänteitä (15).
8. Eräs tämän testimenetelmän rajoitus on se, että vaikka siinä otetaan huomioon joitakin kanin silmä-ärsytystestissä arvioituja silmävaikutuksia ja jossain määrin niiden vakavuus, siinä ei tarkastella sidekalvon ja värikanalon vaurioita. On myös ehdotettu kaninsilmätutkimusten perusteella, että vaikka ICE-testissä ei sinänsä voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta, voidaan kuitenkin arvioida sarveiskalvovaurion alkusyvyys ja sen avulla erottaa palautuvat ja palautumattomat vaikutukset (16). ICE-menetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä myrkyllisyyttä.
9. ICE-testimenetelmän käyttökelpoisuutta ja rajoituksia ei-vakavien ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi pyritään selvittämään lisää (ks. myös kohta 48). Käyttäjää rohkaistaan myös antamaan näytteitä ja/tai tuloksia validointijärjestöille, jotta ICE-testimenetelmän mahdollisia tulevia käyttötapoja, kuten ei-vakavien silmää ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistusta, voidaan arvioida virallisesti.

10. Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määrittymenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 2 mainittuja pätevyuden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä ICE-testin suorituksessa ennen kuin se toimittaa ICE-määrittystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

11. ICE-testimenetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa kanan silmän lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro*. Tässä testimenetelmässä testiaineen aiheuttama vaurio arvioidaan määrittämällä sarveiskalvon turpoaminen, sameus ja fluoreseiinin retentio. Kaksi jälkimmäistä muuttujaa arvioidaan kvalitatiivisesti, kun taas sarveiskalvon turpoaminen voidaan määrittää kvantitatiivisesti. Kukin mittaus joko muunnetaan kvantitatiiviseksi arvoksi yleisen ärsyttävyyssindeksin laskemiseksi tai sille osoitetaan kvalitatiivinen kategoria, jonka avulla vahvistetaan sitten luokitus *in vitro* silmää syövyttäväksi ja vakavasti silmää ärsyttäväksi. Kummankin tuloksen avulla voidaan sitten ennustaa testiaineen *in vivo* -silmäsyövyttävyyttä ja kykyä aiheuttaa vakavaa ärsytystä (ks. päätöskriteerit).

Kanansilmien lähde ja kanojen ikä

12. Tässä määrittäyksessä on tavanomaisesti käytetty teurastamosta saaduista kanoista (jotka on teurastettu elintarviketuotantoa varten) kerättyjä silmiä, jolloin ei ole tarvittu laboratorioeläimiä. Testiin voidaan käyttää vain silmiä, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä.
13. Parasta kanan ikää ei ole arvioitu kontrolloidussa tutkimuksessa. Testimenetelmässä on tavanomaisesti käytetty sen ikäisiä ja painoisia kanoja kuin ovat siipikarjateurastamossa tavanomaisesti teurastetut kevätkananpojat (ts. noin 7 viikon ikäisiä, paino 1,5–2,5 kg).

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

14. Päät pitäisi irrottaa heti kanojen tainnutuksen jälkeen, mikä tehdään tavallisesti sähkösokillä, ja sen jälkeen, kun kaula on katkaistu verenlaskua varten. Olisi hyvä löytää laboratorion lähellä sijaitseva paikallinen kanojen teurastamo, jotta kanojen päät voidaan kuljettaa teurastamosta laboratorioon riittävän nopeasti, että pilaantuminen ja/tai bakteerikontaminaatio ovat mahdollisimman vähäisiä. Kananpäiden keräämisen ja silmien käytön (ICE-testissä) välisen ajan pitäisi olla mahdollisimman lyhyt (mieluiten alle kaksi tuntia), ja pitäisi osoittaa, etteivät määrittystulokset ole sen takia epäluotettavia. Nämä tulokset perustuvat silmien valintaperusteisiin sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden vastaisiin. Kaikkien määrittäyksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta tietynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.
15. Koska silmät dissekoidaan laboratoriossa, koskemattomat päät kuljetetaan teurastamosta ympäristön lämpötilassa muovilaatikoissa kosteutettuina isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella kostutetuilla pyyheliinoilla.

ICE-testissä käytettävien silmien valintaperusteet

16. Silmät, jotka värjäytyvät voimakkaasti fluoreseiinillä (> 0,5) tai joiden sarveiskalvon sameus on korkea (> 0,5) silmämunan poistamisen jälkeen, hylätään.
17. Kussakin käsitellyssä ryhmässä ja samanaikaisesti määritettävässä positiivisessa kontrollissa on oltava vähintään kolme silmää. Negatiivisessa kontrolliryhmässä tai liuotinkontrollissa (jos käytetään muuta liuotinta kuin fysiologista keittosuolaliuosta) on oltava vähintään yksi silmä.

MENETTELY

Silmien valmistelu

18. Silmäluomet leikataan huolellisesti pois varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Sarveiskalvon eheys arvioidaan nopeasti lisäämällä tippa 2-prosenttista (w/v) natriumfluoreseiiniä sarveiskalvon pinnalle muutamaksi sekunniksi, minkä jälkeen huuhdotaan isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella. Fluoreseiinillä käsiteltyjä silmiä tarkastellaan rako-valomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, ettei sarveiskalvo ole vahingoittunut (ts. fluoreseiinin retentio ja sarveiskalvon sameusarvo on enintään 0,5).
19. Jos silmä on vahingoittumaton, se dissekoidaan kallosta varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Silmämunaa vedetään irti silmäkuopasta pitäen tiukasti vilkkukalvosta kiinni kirurgisilla pihdeillä, ja silmän lihakset leikataan käyrillä, tylppäpätkärisillä saksilla. On tärkeää, ettei sarveiskalvoa vahingoiteta liialla paineella (kompressioartefakta).
20. Kun silmää poistetaan silmäkuopasta, pitäisi osa näköhermoa jättää kiinni ja näkyville. Kun silmä on poistettu silmäkuopasta, se asetetaan imupaperialustalle, ja vilkkukalvo ja muu sidekudos leikataan pois.

21. Silmämunasta poistettu silmä kiinnitetään ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pitimeen siten, että sarveiskalvo on pystysuorassa. Pidin siirretään tiputuslaitteen (superfuusiolaite) kammioon (16). Pitimet asetetaan tiputuslaitteeseen siten, että koko sarveiskalvoon voidaan kohdistaa isotonisesta fysiologisesta keittosuolaliuksesta koostuva tiputus. Tiputuslaitteen kammioiden lämpötila on pidettävä arvossa $32 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Lisäyksessä 3 esitetään kaavio tyypillisestä tiputuslaitteesta ja silmänpitimistä. Niitä saa kaupallisesti tai ne voi rakentaa itse. Laite voidaan mukauttaa yksittäisen laboratorion tarpeisiin (esimerkiksi useille silmille).
22. Kun silmät on asetettu tiputuslaitteeseen, niitä tarkastellaan jälleen rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, etteivät ne ole vahingoittuneet dissektiossa. Sarveiskalvon paksuus sen kärjessä olisi myös mitattava rakovalomikroskooppiin kuuluvalla syvyydenmittauslaitteella. Jos silmien i) fluoreseiniin retentioarvo on yli 0.5; ii) sarveiskalvon sameus on yli 0.5; tai iii) silmissä on muita vahingoittumisen merkkejä, ne on vaihdettava toisiin. Niistä silmistä, joita ei ole hylätty edellä mainittujen kriteerien perusteella, hylätään sellaiset, joiden sarveiskalvon paksuus poikkeaa yli 10 prosentilla kaikkien silmien keskiarvosta. Käyttäjien pitäisi olla tietoisia siitä, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on erilainen. Raon leveys olisi asetettava arvoon 0,095 mm.
23. Kun kaikki silmät on tutkittu ja hyväksytty, silmiä inkuboidaan noin 45–60 min, jotta ne tasapainottuvat testijärjestelmässä ennen annostelua. Tasapainottumisjakson jälkeen otetaan sarveiskalvon paksuudelle ja sameudelle lukema perusarvoa varten (nolla-arvo ajanhetkellä 0). Dissektion yhteydessä määritettyä fluoreseiiniarvoa käytetään fluoreseiniirention perusarvona.

Testiaineen annostelu

24. Välittömästi nolla-arvojen mittausten jälkeen silmä (telineinen) poistetaan tiputuslaitteesta, asetetaan vaakasuoraan, ja testiaine annostellaan sarveiskalvolle.
25. Nestemäiset testiaineet testataan tavallisesti laimentamattomina, mutta ne voidaan laimentaa tarvittaessa (esimerkiksi jos se kuuluu tutkimussuunnitelmaan). Aineet laimennetaan mieluiten fysiologisella keittosuolaliuksella. Muitakin liuottimia voidaan käyttää valvotuissa olosuhteissa, mutta muiden liuottimien kuin fysiologisen keittosuolaliuksen käyttökelpoisuus olisi osoitettava.
26. Nestemäiset testiaineet annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää kokonaan ja tasaisesti sarveiskalvon pinnan; tavallinen tilavuus on 0,03 ml.
27. Kiinteät aineet olisi mahdollisuuksien mukaan jauhettava mahdollisimman hienoksi morttelissa huhmareella tai vastaavalla jauhamislaitteella. Jauhe annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää pinnan tasaisesti; tavallinen määrä on 0,03 g.
28. Testiaineen (nesteiden tai kiinteiden aineiden) annetaan vaikuttaa 10 sekunnin ajan, ja se huuhdellaan silmästä isotonisella fysiologisella keittosuolaliuksella (noin 20 ml) huoneenlämpötilassa. Telineessä oleva silmä asetetaan uudelleen tiputuslaitteeseen pystysuoraan.

Kontrolliaineet

29. Kussakin kokeessa on oltava mukana negatiiviset eli liuotin/vehikkelikontrollit ja positiiviset kontrollit.
30. Testattaessa 100-prosenttisia nesteitä tai kiinteitä aineita käytetään ICE-testissä negatiivisena kontrollina fysiologista keittosuolaliuosta, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytystä.
31. Testattaessa laimennettuja nesteitä käytetään testissä samanaikaisesti liuotin/vehikkelikontrolliryhmää, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytystä. Kuten kohdassa 25 mainitaan, liuotinta/vehikkeliiä saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

32. Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan tunnettu silmiä ärsyttävä aine positiivisena kontrollina, jotta voidaan varmistaa, että saadaan asianmukainen vaste. Koska ICE-määrittystä käytetään tässä testimenetelmässä syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi, positiivisen kontrollin olisi mielellään oltava vertailuaine, joka aiheuttaa tässä testimenetelmässä vakavan vasteen. Vakava ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida. Positiivisesta kontrollista olisi hankittava riittävästi *in vitro*-tuloksia, jotta positiiviselle kontrollille voidaan laskea tilastollisesti määritelty hyväksyttävä alue. Jos tietylle positiiviselle kontrollille ei ole saatavilla riittävästi aiempia ICE-testimenetelmällä saatuja tuloksia, on tietojen saamiseksi mahdollisesti tehtävä lisätutkimuksia.
33. Nestemäisten testiaineiden positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi 10-prosenttista etikkahappoa tai 5-prosenttista bentsalkoniumkloridia, ja kiinteiden aineiden positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi natriumhydroksidia tai imidatsolia.
34. Vertailuaineet ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepiestet

35. Käsitellyt sarveiskalvot arvioidaan ennen käsittelyä ja alkaen 30, 75, 120, 180 ja 240 minuuttia (\pm 5 minuuttia) käsittelyn jälkeen tehdyn huuhtelun jälkeen. Näillä ajankohdilla saadaan riittävä määrä mittauksia neljän tunnin käsittelyn aikana, ja mittausten välillä on riittävästi aikaa tehdä kaikista silmistä tarvittavat havainnot.
36. Arvioidut päätepiestet ovat sarveiskalvon sameus, turpoaminen, fluoreseiinin retentio ja morfologiset vaikutukset (esimerkiksi epiteelin pistemäinen syöpyminen tai irtoaminen). Kaikki määrytykset (lukuun ottamatta fluoreseiinin retentiota, joka määritetään vain ennen käsittelyä ja 30 minuutin kuluttua testiaineen annostelusta) tehdään kullakin mainitulla ajanhetkellä.
37. On suositeltavaa ottaa valokuvia osoitukseksi sarveiskalvon sameudesta, fluoreseiinin retentiosta, morfologisista muutoksista ja histopatologiasta (jos sellaisia tutkimuksia on tehty).
38. Kun viimeinen tutkimus on tehty neljän tunnin kohdalla, suositellaan, että silmät säilytetään sopivassa kiinnitysaineessa (esimerkiksi neutraalissa puskuroidussa formaliinissa), jotta voidaan mahdollisesti tehdä histopatologisia tutkimuksia.
39. Sarveiskalvon turpoaminen arvioidaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista, jotka tehdään rakovalomikroskooppin kuuluvalla optisella paksuudenmittauslaitteella. Turpoaminen ilmoitetaan prosenttilukuna, ja se lasketaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista seuraavalla kaavalla:

$$\left(\frac{\text{sarveiskalvon paksuus hetkellat} - \text{sarveiskalvon paksuus hetkellat} = 0}{\text{sarveiskalvon paksuus hetkellat} = 0} \right) \times 100$$

40. Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon turpoamisen prosenttikeskisarvo lasketaan kaikille havaintojankohdille. Kullekin testiaineelle annetaan yleinen kategoriaa koskeva arvo sarveiskalvon turpoamiselle saadun korkeimman (minä tahansa ajankohtana havaitun) keskiarvon perusteella.
41. Sarveiskalvon sameus lasketaan käyttäen sitä sarveiskalvon alaa, joka antaa suurimman sameusarvon. Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon keskimääräinen sameusarvo lasketaan kaikille havaintojankohdille. Kullekin testiaineelle annetaan yleinen kategoriaa koskeva arvo sarveiskalvon sameudelle saadun korkeimman (minä tahansa ajankohtana havaitun) keskimääräisen arvon perusteella (Taulukko 1).

Taulukko 1

Sarveiskalvon sameusarvot

Arvo	Havainto
0	Ei sameutta
0,5	Hyvin heikkoa sameutta

Arvo	Havainto
1	Hajanaisia sameita alueita; värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä
2	Selvästi erottuva läpikuultava alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan hämäriä
3	Vakavaa sarveiskalvon sameutta; värikalvosta ei ole näkyvillä erityisiä yksityiskohtia; silmäterän kokoa voi tuskin erottaa
4	Täysin sama sarveiskalvo; silmäterää ei näy

42. Kaikkien testattujen silmien fluoreseiinin retention keskiarvo lasketaan ainoastaan 30 minuutin ajanhetkelle. Sitä käytetään kullekin testiaineelle annettavaan yleiseen kategoria-arvoon (taulukko 2).

Taulukko 2

Fluoreseiinin retention arvot

Arvo	Havainto
0	Ei fluoreseiinin retentiota
0,5	Hyvin vähäistä yksittäisten solujen värjäytymistä
1	Yksittäisiä värjäytyneitä soluja on hajaantuneena sarveiskalvon käsitellylle alueelle
2	Tiiviitä ja tiheitä yksittäisten värjäytyneiden solujen rykelmiä
3	Laajoja sarveiskalvon alueita, joilla esiintyy tiheää fluoreseiinivärjäytymistä

43. Morfologisia vaikutuksia ovat esimerkiksi sarveiskalvon epiteelisolujen "pistemäinen syöpyminen", epiteelin "irtoaminen", sarveiskalvon pinnan "karhentuminen" ja testiaineen "takertuminen" sarveiskalvoon. Näiden löydösten vakavuus voi vaihdella, ja ne voivat esiintyä samanaikaisesti. Näiden löydösten luokittelu riippuu tutkijan tulkinasta.

MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET

Mittaustulosten arviointi

44. Sarveiskalvon sameutta, turpoamista ja fluoreseiinin retentiota koskevat tulokset olisi arvioitava erikseen, jotta kullekin päätepisteelle voidaan muodostaa ICE-luokka. Kutakin päätepistettä koskevat ICE-luokat yhdistetään sitten ärsytysluokituksen muodostamiseksi kullekin testiaineelle.

Päätöskriteerit

45. Kun kukin päätepiste on arvioitu, voidaan ICE-luokat osoittaa ennalta määrätyn vaihteluvälin perusteella. Sarveiskalvon paksuus (taulukko 3), sameus (taulukko 4) ja fluoreseiinin retentio (taulukko 5) ICE-luokkia käyttäen tulkitaan seuraavien asteikkojen mukaisesti:

Taulukko 3

ICE-luokituskriteerit sarveiskalvon paksuudelle

Keskimääräinen sarveiskalvon turpoaminen (%) (*)	ICE-luokka
0–5	I
> 5–12	II
> 12–18 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	II
> 12–18 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 18–26	III

Keskimääräinen sarveiskalvon turpoaminen (%) (*)	ICE-luokka
> 26–32 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 26–32 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	IV
> 32	IV

(*) Sarveiskalvon turpoamisarvoja voi soveltaa vain, jos paksuus on mitattu Haag-Streit BP900 -rakovalomikroskoopilla, joka on varustettu syvyydenmittauslaitteella nro I, raon leveys asetettuna arvoon 9½, mikä vastaa 0,095 mm:iä. Käyttäjien pitäisi olla tietoisia siitä, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on erilainen.

Taulukko 4

ICE-luokituskriteerit sameudelle

Keskimääräinen suurin sameusarvo (*)	ICE-luokka
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Ks. taulukko 1.

Taulukko 5

ICE-luokituskriteerit keskimääräiselle fluoreseiinin retentiolle

Keskimääräinen fluoreseiinin retentioarvo 30 minuuttia käsittelyn jälkeen (*)	ICE-luokka
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Ks. taulukko 2.

46. Testiaineen yhdistetty *in vitro* -ärsyttävyyssuokitus arvioidaan lukemalla ärsyttävyyssuokitus, joka vastaa sarveiskalvon turpoamiselle, sarveiskalvon sameudelle ja fluoreseiinin retentiolle saatujen kategorioiden yhdistelmää, soveltamalla taulukossa 6 esitettyä järjestelmää.

Taulukko 6

Yhdistetyt *in vitro* -ärsyttävyyssuokitukset

Luokittelu	Kolmen päätepisteen yhdistelmät
Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Sarveiskalvon sameus ≥ 3, 30 minuutin kohdalla (vähintään kahdessa silmässä) Sarveiskalvon sameus = 4 millä tahansa mittausajankohdalla (vähintään kahdessa silmässä) Vakava epiteelin irtoaminen (vähintään yhdessä silmässä)

(*) Harvinaisimmat yhdistelmät.

47. Kuten 1 kohdassa mainittiin, jos testiainetta ei tunnista silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi, on testausta jatkettava luokitusta ja merkintöjen määräämistä varten. ICE-testimenetelmän yleinen tarkkuus on välillä 83 % (120/144) – 87 % (134/154), siinä saatujen värien positiivisten tulosten määrä on välillä 6 % (7/122) – 8 % (9/116) ja värien negatiivisten tulosten määrä välillä 41 % (13/32) – 50 % (15/30), kun menetelmää käytetään tunnistettaessa aineita silmää syövyttäväksi ja silmää vakavasti ärsyttäväksi, verrattuna kanin silmää *in vivo* käytävällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin luokiteltuna EPAn (1), EU:n (2) tai GHS:n (3) luokitusjärjestelmien mukaan. Kun tietokannasta jätetään pois tiettyihin kemiallisiin (alkoholit, pinta-aktiiviset aineet) ja fysikaalisiin (kiinteät aineet) luokkiin kuuluvat aineet, ICE-menetelmän tarkkuus EPAn, EU:n ja GHS:n luokitusjärjestelmissä vaihtelee välillä 91 % (75/82) – 92 % (69/75), värien positiivisten tulosten määrä on välillä 5 % (4/73) – 6 % (4/70) ja värien negatiivisten tulosten määrä välillä 29 % (2/7) – 33 % (3/9) (4).
48. Vaikka testiaineelle ei saataisi luokitusta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi aineeksi, ICE-menetelmässä saaduista tuloksista voi olla hyötyä käytettynä yhdessä *in vivo* -kaninsilmätestissä tai asianmukaisesti validoidussa *in vitro* -testissä saatujen testitulosten kanssa, kun arvioidaan ICE-menetelmän käyttökelpoisuutta ja rajoituksia muiden kuin vakavasti ärsyttävien ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamisessa (valmisteilla on ohjeet *in vitro* -silmämyrkyllisyystestimenetelmien käytöstä).

Tutkimuksen hyväksymiskriteerit

49. Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten tai liuotin/vehikkelikontrollien antama ärsyttävyyshuokitus on "ei ärsyttävä" ja samanaikaisesti tehtyjen positiivisten kontrollien antama ärsyttävyyshuokitus on "vakavasti ärsyttävä / syövyttävä".

Testiseloste

50. Testiselosteessa olisi annettava seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorittamiselle:

Testi- ja kontrolliaineet

Kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan;

CAS-numero, jos se tunnetaan;

Aineen tai seoksen puhtausaste tai koostumus (painoprosenteina), jos tieto on saatavilla;

Testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus;

Tarvittaessa testi- ja/tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen);

Stabiilius, jos se tiedetään.

Sponsorin ja testauslaitosta koskevat tiedot:

Sponsorin nimi ja osoite, testilaitos ja tutkimusjohtaja;

Silmien lähde (esimerkiksi laitos, josta ne on kerätty);

Silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten silmien keräyspäivä ja kellonaika, aika, joka on kulunut keräyksestä siihen asti, kun testi aloitettiin);

Erytistietoja eläimistä, joista silmät on kerätty (kuten ikä, sukupuoli, paino), jos tiedot ovat saatavilla.

Käytetyn testimenetelmän ja protokollan perustelu

Testimenetelmän integriteetti

Menettely, jolla testimenetelmän integriteetti (ts. tarkkuus ja luotettavuus) ajan suhteen varmistetaan (esimerkiksi pätevöittäminen käytettyjen aineiden säännöllinen testaus, aiempien negatiivisten ja positiivisten kontrollitulosten käyttö).

Hyväksyttävän testin kriteerit

Tapauksen mukaan hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit.

Testausolosuhteet

Kuvaus käytetystä testijärjestelmästä;

Käytetty rakovalomikroskooppi (esimerkiksi sen malli);

Käytetyn rakovalomikroskoopin laiteasetukset;

Käytettyjä kanan silmiä koskevat tiedot, myös niiden laatua koskeva lausuma;

Käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti;

Käytetyt testiainekonsentraatiot;

Kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista;

Viittaus mallia koskeviin aiempiin tuloksiin (esimerkiksi negatiiviset ja positiiviset kontrollit, pätevöittäminen käytetyt aineet, vertailuaineet);

Kuvaus käytetyistä arviointikriteereistä.

Tulokset

Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tarvittaessa valokuvat silmistä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmä

LÄHDEKIRJALLISUUS

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.
- (3) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York ja Geneve, 2007. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

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

- (6) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/ETY ja 2000/21/EY kumoamisesta. EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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. Intergency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Intergency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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). Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [<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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [<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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [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. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksytyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuudella mitataan testimenetelmän suoritusta, ja se on eräs ”relevanssin” näkökohta. Termiä käytetään usein ”konkordanssin” kanssa vaihtoehtoisena, jolloin sillä tarkoitetaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Vertailuaine: Aine, johon testiainetta verrataan. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) se saadaan vakaana pysyvänä ja luotettavasta lähteestä; ii) sen rakenne ja toiminta ovat samankaltaisia testattavan aineluokan kanssa; iii) sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tunnetaan; iv) se tukee tunnetuista vaikutuksista saatuja tietoja; ja v) sen vaikutuskyky halutun vasteen vaihtelualueella tunnetaan.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota.

Sarveiskalvon turpoaminen: ICE-testissä objektiivisesti mitattu sarveiskalvon pullistumisen määrä, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle. Turpoaminen ilmaistaan prosenttilukuna ja lasketaan sarveiskalvon paksuuden perustasomittauksista (ennen annostelua) ja paksuuksista, jotka on mitattu säännöllisin väliajoin sen jälkeen, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle ICE-testissä. Sarveiskalvon turpoamisaste osoittaa sarveiskalvon vauriota.

EPA-kategoria 1: Syövyttävä (palautumaton silmäkudoksen tuhoutuminen) tai yli 21 vuorokautta kestävä sarveiskalvoon kohdistuva vaikutus tai ärsytys (1).

EU:n R41-luokka: Silmän kudonsvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (2).

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Fluoreseiinin retentio: ICE-testissä tehty subjektiivinen mittafluoreseiininatriumin määrästä, jonka epiteelisolut pitävät sarveiskalvossa, kun se on altistettu testiaineelle. Sarveiskalvon turpoamisaste osoittaa sarveiskalvon epiteelin vauriota.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa ehdotetaan kemikaalien (aineet ja seokset) luokitusta fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja osoitetaan niille vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten (mukaan luettuina työnantajat, työntekijät, kuljettajat, kuluttajat ja pelastushenkilöstö) ja ympäristön suojelemiseksi (3).

GHS-kategoria 1: Silmän kudonsvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (3).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Ei-ärsyttävä: Aineet, joita ei ole luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan I, II tai III; EU:n kategoriaan R41 tai R36; tai GHS:n kategoriaan 1, 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineeksi (1)(2)(3).

Silmää syövyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosaauriota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäväksi aineeksi (1) (2) (3).

Silmää ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen, kun sitä on annosteltu silmän etupinnalle; b) aineet, jotka on luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan II tai III; EU:n kategoriaan R36; tai GHS:n kategoriaan 1, 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineeksi (1)(2)(3).

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmän etupinnalle annosteltuna kudosaauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäväksi aineeksi (1) (2) (3).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vakava vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Luotettavuus: Arvo, joka osoittaa, missä määrin testimenetelmä pystytään suorittamaan uusittavalla tavalla samassa laboratorioissa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Arvo määritetään laskemalla laboratori-
onsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratoriionsisäinen toistettavuus.

Rakovalomikroskooppi: Laitte, jolla tarkastellaan silmää suoraan kaksioksulaarisen mikroskoopin suurennoksella luomalla stereoskooppinen, pysty kuva. Laitetta käytetään ICE-testissä kanan silmän etukammion tarkasteluun ja sarveiskalvon pakisuuden objektiiviseen mittaukseen mikroskoopin liitetyn syvyttä mittaavan laitteen avulla.

Liuotin/vehikkelikontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai vehikkeli, ja joka prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testiaine on liuotettu samaan liuotteeseen tai vehikkeliin. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai vehikkeli testijärjestelmän kanssa.

Vaiheittainen testaus: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testiainetta koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietystä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testiaineen ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testiaineen ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määrittää aukottomasti.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka validointitutkimukset on saatettu päätökseen ja relevanssi (tarkkuus mukaan luettuna) ja luotettavuus tiettyä tarkoitusta varten on määritetty. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää aineen vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT ICE-TESTIMENETELMÄLLE

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, se voi osoittaa teknisen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 10 aineen silmäsyövyttävyysluokituksen. Aineet on valittu siten, että ne edustavat sellaisia paikallisen silmä-ärsytyksen ja/tai-syövytyksen vasteita, jotka perustuvat *in vivo* kaninsilmätestissä (TG 405) saatuihin tuloksiin (ts. YK:n GHS-järjestelmän kategoriat 1, 2A, 2B tai "Ei luokiteltu ja merkitty") (3) (7). Kun otetaan huomioon näiden määritysten validoitu hyödyllisyys (ts. ainoastaan silmää syövyttävien ja/tai silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamista varten), vain kahta luokitustarkoituksiin käytettävää testitulosta (syövyttävät ja/tai silmää vakavasti ärsyttävät aineet tai ei-syövyttävät ja/tai ei vakavasti ärsyttävät aineet) käytetään pätevyyden osoittamiseksi. Muita valintakriteerejä ovat se, että aineet ovat kaupallisesti saatavilla, että saatavilla on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja ja että on laadukkaita tietoja niistä kahdesta *in vitro* -menetelmästä, joille parhaillaan kehitetään testiohjeita. Tästä syystä ärsyttävät aineet silmätoksisuuden *in vitro* -testimenetelmien validointiin valittiin ICCVAM:n 122 suositellun vertailuaineen luettelosta (ks. lisäys H, ICCVAM:n suositeltujen vertailuaineiden luettelo) (4). Vertailutiedot ovat saatavilla nautan sarveiskalvon sameus- ja läpäisevyyssmenetelmälle (BCOP) ja ICE-menetelmälle laadituista tausta-asiakirjoista (18) (19).

Taulukko 1

Suositellut aineet ICE-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olo-muoto:	<i>In vivo</i> -luokitus (2)	<i>In vitro</i> -luokitus (3)
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amiidiini	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Triklloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Kategoria 2A	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
Etyyli-2-metyyliaseto-asettaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Kategoria 2B	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Kategoria 2A	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
n-Heksaani	110-54-3	Hiilivety (asyklinen)	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) Kunkin testiaineen kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteesta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyillä *in vivo* -testillä (OECD TG 405) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (3)(7).

(3) Perustuu BCOP- ja ICE-testien tuloksiin.

Lisäys 3

ICE-testissä käytetyn tiputuslaitteen ja silmänpitimiä kaaviot

(ks. Burton et al. (17), jossa esitetään yleinen kuvaus tiputuslaitteesta ja silmänpitimestä)

