

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 1152/2010**z dne 8. decembra 2010****o spremembi Uredbe (ES) št. 440/2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) zaradi prilagoditve tehničnemu napredku****(Besedilo velja za EGP)**

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH), o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije ter spremembi Direktive 1999/45/ES ter razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES⁽¹⁾, zlasti člena 13(3) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Uredba Komisije (ES) št. 440/2008⁽²⁾ določa testne metode za ugotavljanje fizikalno-kemijskih lastnosti, toksičnosti in ekološke toksičnosti snovi, ki jih je treba uporabiti v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006.
- (2) Uredbo (ES) št. 440/2008 je treba posodobiti tako, da se vanjo prednostno vključita novi testni metodi za ugotavljanje dražilnosti oči in vitro, ki jih je pred kratkim sprejel OECD, da se število živali za poskusne namene zmanjša v skladu z Direktivo Sveta 86/609/EGS z dne

24. novembra 1986 o približevanju zakonov in drugih predpisov držav članic o varstvu živali, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene⁽³⁾. Posvetovanja z zainteresiranimi stranmi o tem predlogu so bila opravljena.

- (3) Uredbo (ES) št. 440/2008 je zato treba ustrezno spremeniti.
- (4) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem odbora, ustanovljenega s členom 133 Uredbe (ES) št. 1907/2006 –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

V delu B Priloge k Uredbi (ES) št. 440/2008 se v skladu s prilogo k tej uredbi dodata poglavji B.47 in B.48.

Člen 2

Ta uredba začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je zavezujoča v celoti in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 8. decembra 2010

Za Komisijo

Predsednik

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ UL L 396, 30.12.2006, str. 1.

⁽²⁾ UL L 142, 31.5.2008, str. 1.

⁽³⁾ UL L 358, 18.12.1986, str. 1.

PRILOGA

„B. 47 TESTNA METODA ZA DOLOČANJE MOTNJAVE IN PREPUSTNOSTI ROŽENICE GOVEDA ZA UGOTAVLJANJE JEDKIH IN ZELO DRAŽILNIH SNOVI ZA OČI (BCOP)

UVOD

1. Testna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda (BCOP) je testna metoda *in vitro*, ki se pod določenimi pogoji in z določenimi omejitvami uporablja za razvrščanje snovi in zmesi med jedke in zelo dražilne za oči (1) (2) (3). Pri tej testni metodi so zelo dražilne snovi tiste snovi, ki povzročajo poškodbe oči, ki se pri zajcu ohranijo najmanj 21 dni po aplikaciji. Čeprav testa *in vivo* na očeh zajcev ne more nadomestiti popolnoma, se test BCOP priporoča kot del stopenjske testne strategije za regulativno razvrščanje in označevanje za posebna področja uporabe (4)(5). Testne snovi in zmesi (6) se lahko razvrstijo med jedke ali zelo dražilne snovi za oči, ne da bi bilo potrebno opraviti dodatno testiranje na zajcih. Snov z negativnim testnim rezultatom bi bilo treba testirati na zajcih s pomočjo sekvenčne testne strategije, ki je določena v testni smernici OECD 405 (7) (poglavje B. 5 te priloge).
2. V tej testni metodi so opisani postopki za oceno potencialne jedkosti in močne dražilnosti testne snovi za oči glede na njeno sposobnost, da v izolirani roženici goveda povzroča motnjavo in povečano prepustnost. Toksični učinki na roženico se merijo z: (i) zmanjšanim prenosom svetlobe (motnjava) in (ii) povečanim prehajanjem barvila natrijevega fluoresceina (prepustnost). Oceniti motnjave in prepustnosti roženice po aplikaciji testne snovi skupaj pomenita dražilnost *in vitro* (IVIS), ki se uporablja za razvrstitev testne snovi v različne stopnje draženja.
3. S testno metodo BCOP so bile testirane tudi dražilne snovi, ki povzročajo poškodbe oči, ki izginejo v manj kot 21 dneh, in nedražilne snovi. Vendar natančnost in zanesljivost testne metode BCOP pri snoveh iz teh dveh kategorij nista bili ocenjeni formalno.
4. Opredelitve so navedene v dodatku I.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

5. Ta testna metoda temelji na protokolu testne metode BCOP Medagencijskega usklajevalnega odbora za validacijo alternativnih metod (ICCVAM)(8), ki je bil pripravljen po mednarodni študiji o validaciji (4)(5)(9), pri kateri sta sodelovala Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM) in Japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM). Protokol temelji na informacijah, ki jih je prispeval Inštitut za raziskave *in vitro* (IIVS), in protokolu INVITTOX 124 (10), ki se je uporabil pri predvalidacijski študiji o preskusu BCOP, ki je bila opravljena med leti 1997–1998 in ki jo je sponzorirala Evropska skupnost. Oba protokola temeljita na testni metodologiji BCOP, o kateri je prvi poročal Gautheron *et al.* (11).
6. Opredeljene omejitve za to testno metodo temeljijo na visokem številu lažno pozitivnih rezultatov za alkohole in ketone ter visokem številu lažno negativnih rezultatov za trdne snovi, zbranih v podatkovni zbirki za validacijo (glej točko 44) (5). Če se snovi iz teh kemijskih in fizikalnih razredov izključijo iz podatkovne zbirke, se natančnost BCOP v sistemih za razvrščanje snovi EU, EPA in GHS bistveno izboljša (5). Pri tem preskusu (tj. za ugotavljanje izključno jedkih in zelo dražilnih snovi za oči) lažno negativni rezultati niso kritični, saj bi se take snovi nato preskušale na zajcih ali, odvisno od regulativnih zahtev, z drugimi ustrezno potrjenimi testi *in vitro*, pri katerih se uporablja sekvenčna testna strategija, ki temelji na teži dokazov. Poleg tega nekaterih kemijskih ali proizvodnih razredov (npr. zmesi) s trenutno validacijsko podatkovno zbirko ni bilo mogoče ustrezno oceniti. Vendar pa bi lahko preskuševalci to testno metodo uporabili pri vseh vrstah testnega materiala (tudi pri zmeseh), pri čemer bi bil pozitiven rezultat sprejemljiv kot indikator za jedko ali zelo dražilno snov za oči. Pozitivne rezultate, pridobljene z uporabo alkoholov ali ketonov, je treba razlagati previdno, saj obstaja tveganje, da so vanje vključeni tudi lažno pozitivni rezultati.
7. Pri vseh postopkih na očesih in roženicah goveda je treba upoštevati veljavna pravila in postopke testnega urada o ravnanju z živalskim materialom, kamor spadajo med drugim tudi tkiva in tkivne tekočine. Priporočajo se splošni previdnostni ukrepi za laboratorije (12).
8. Čeprav testna metoda upošteva nekatere učinke, ocenjene s testno metodo za ugotavljanje dražilnih snovi na očeh zajcev, in do določene mere tudi njihovo resnost, je kljub temu omejena, saj ne upošteva poškodb veznice in šarenice. Čeprav tudi same reverzibilnosti poškodb roženice s preskusom BCOP ni mogoče oceniti, je bilo na podlagi študij na očeh zajcev kljub temu predlagano, da se oceni prvotna globina poškodbe roženice ter tako razlikuje med ireverzibilnimi in reverzibilnimi učinki (13). Treba je tudi opozoriti, da s testno metodo BCOP ni mogoče oceniti potencialne sistemske toksičnosti, povezane z izpostavljenostjo oči.

9. Trenutno potekajo prizadevanja za nadaljnjo karakterizacijo uporabnosti in omejitev preskusa BCOP za ugotavljanje lažje dražilnih in nedražilnih snovi (glej tudi točko 45). Uporabnikom se priporoča, da organizacijam za validacijo zagotovijo vzorce in/ali podatke za uradno oceno morebitnih prihodnjih uporab testne metode BCOP, vključno za ugotavljanje lažje dražilnih in nedražilnih snovi.
10. Laboratoriji, ki ta preskus opravljajo prvič, morajo uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz dodatka 2. Te kemikalije uporabijo, da dokažejo, da so tehnično sposobni izvajati testno metodo BCOP, preden podatke o testu BCOP predložijo za regulativno razvrstitev nevarnosti.

NAČELO TESTA

11. Testna metoda BCOP je organotipski model, ki zagotavlja kratkoročno ohranjanje običajne fiziološke in biokemijske funkcije roženice goveda *in vitro*. Pri tej testni metodi se poškodba, ki jo povzroči testna snov, oceni tako, da se spremembe motnjave in prepustnosti roženice merijo kvantitativno z opacitometrom oziroma spektrofotometrom vidne svetlobe. Obe meritvi se uporabita za izračun IVIS, na podlagi katerega se dodeli kategorija nevarnosti dražilnosti *in vitro*, s pomočjo katere se predvidi potencialni dražilni učinek testne snovi *in vivo* (glej merila za odločanje).
12. Pri testni metodi BCOP se uporabljajo izolirane roženice oči sveže zaklanega goveda. Motnjava roženice se meri kvantitativno in ustreza količini svetlobe, ki prodre skozi roženico. Prepustnost se meri kvantitativno in ustreza količini barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi celotno debelino roženice in ga zazna medij v zadnjem delu držala. Testne snovi se dodajo v sprednji del držala za roženico in se tako aplicirajo na epitelno površino roženice. Dodatek 3 vsebuje opis in sliko držala, ki se uporablja za BCOP. Držala za roženico ponujajo na trgu različna podjetja, laboratoriji pa jih lahko izdelajo tudi sami.

Izvor in starost oči goveda ter izbor živalskih vrst

13. Govedo, ki se zakolje v klavnica, je običajno namenjeno za človeško prehrano ali druge komercialne uporabe. Pri testih BCOP se kot vir roženic uporabljajo samo zdrave živali, primerne za vstop v prehransko verigo. Ker so goveda glede na pasmo, starost in spol različno težka, ni priporočene teže za zakol.
14. Velikost roženice se lahko pri očeh različno starih živali razlikuje. Roženice z vodoravnim premerom $> 30,5$ mm in centralno debelino roženice (CCT) ≥ 1100 μm ima običajno govedo, starejše od osem let, roženice z navpičnim premerom $< 28,5$ mm in CCT < 900 μm pa običajno govedo, mlajše od pet let (14). Zato se oči goveda, starejšega od 60 mesecev, običajno ne uporabljajo. Oči goveda, mlajšega od 12 mesecev, se običajno prav tako ne uporabljajo, saj še niso popolnoma razvite, debelina in premer roženice pa sta bistveno manjša kot pri očeh starejšega goveda. Kljub temu se lahko uporabljajo roženice mladih živali (tj. starih od šest do 12 mesecev), saj ima njihova uporaba nekatere prednosti, npr. večja razpoložljivost, manjši starostni razpon in manjša nevarnost izpostavljenosti goveji spongiformni encefalopatiji za osebje klavnice (15). Ker bi bilo nadaljnje ocenjevanje učinka, ki ga imata velikost in debelina roženice na odzivnost jedkih in zelo dražilnih snovi za oči, koristno, se uporabnike spodbuja, da sporočijo približno starost in/ali težo živali, katerih roženice so uporabili v študiji.

Odvzem in prevoz oči v laboratorij

15. Oči odvzame osebje klavnice. Da bi čim bolj zmanjšali mehanske in druge vrste poškodb oči, jih morajo odvzeti takoj po zakolu. Da oči ne bi bile izpostavljene potencialno dražilnim snovem, osebje klavnice pri spiranju glav živali ne sme uporabljati detergentov.
16. Oči je treba dati v dovolj veliko posodo, jih preliti s Hanksovo uravnoteženo raztopino soli (HBSS) in prepeljati v laboratorij tako, da se njihovo stanje čim manj poslabša in/ali da ne pride do bakterijske okužbe. Ker se oči odvezajo med zakolom, lahko pridejo v stik s krvjo in drugimi biološkimi snovmi, vključno z bakterijami in drugimi mikroorganizmi. Zato mora biti tveganost okužbe čim manjša (tj. posoda, v kateri so oči, se mora hraniti na mokrem ledu, HBSS, ki se uporablja za hrambo oči med prevozom, pa je treba dodati antibiotike [tj. 100 IU/mL penicilina in 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina]).
17. Čas med odvzemom oči in uporabo roženic mora biti pri BCOP čim krajši (običajno se odvezajo in uporabijo isti dan) in ne sme vplivati na zanesljivost testnih rezultatov. Ti temeljijo na merilih za izbor oči ter pozitivnih in negativnih kontrolnih reakcijah. Vsa očesa, uporabljena v preskusu, morajo pripadati isti skupini oči, odvzeti na določen dan.

Merila za izbor oči za uporabo pri testu BCOP

18. Po prihodu v laboratorij se oči skrbno pregledajo, ali so poškodovane, vključno s povečano motnjavo, praskami in neovaskularizacijo. Uporabljajo se lahko samo roženice nepoškodovanih oči.
19. Kakovost vsake roženice se oceni tudi v poznejši fazi preskusa. Roženice z motnjavo več kot sedem enot motnjave (OPOMBA: opacitometer je treba kalibrirati v skladu s standardi za določevanje enot motnjave, glej dodatek 3) je treba po enournem kalibriranju izločiti.
20. Vsaka testna skupina (testna snov, primerjalne negativne in pozitivne kontrole) je sestavljena iz najmanj treh oči. Pri preskusu BCOP je treba za negativno kontrolo uporabiti tri roženice. Ker se roženice odstranijo s celotnega zrkla in pritrdijo v držala za roženice, se lahko zaradi artefaktov, ki nastanejo zaradi prijemanja, vrednosti motnjave in prepustnosti v posameznih primerih spremenijo (tudi pri negativni kontroli). Poleg tega se vrednosti motnjave in prepustnosti roženic z negativno kontrolno reakcijo uporabljajo za korigiranje vrednosti motnjave in preglednosti predmeta testiranja in pozitivnih kontrolnih vzorcev pri izračunih IVIS.

POSTOPEK**Priprava oči**

21. Nepoškodovane roženice se secirajo tako, da se ohrani 2 do 3 mm širok rob beločnice, kar olajša nadaljnje ravnanje, pri čemer je treba paziti, da se epitelij in endotelij roženice ne poškodujeta. Izolirane roženice se pritrdijo v posebej za to izdelana držala, sestavljena iz sprednjega in zadnjega dela držala, na katera je roženica pripeta z epitelno oziroma endotelno stranjo. Oba dela držala se do roba napolnita z ogretim Eaglovim minimalnim osnovnim medijem EMEM (najprej zadnji del držala), pri čemer je treba zagotoviti, da se ne tvorijo mehurčki. Naprava se nato ekvilibrira pri 32 ± 1 °C najmanj eno uro, da se roženice ekvilibrirajo z medijem in da se doseže čim bolj normalna presnova (približna temperatura na površini roženice znaša *in vivo* 32 °C).
22. Po ekvilibriranju se v oba dela držala doda svež, ogret medij EMEM, za vsako roženico pa se zabeležijo izhodiščne vrednosti motnjave. Roženice z makroskopskimi poškodbami tkiva (npr. praskami, pigmentacijo, neovaskularizacijo) ali motnjavo, večjo od sedem enot, se zavržejo. Nato se izračuna povprečna motnjava vseh ekvilibriranih roženic. Za negativno kontrolo (ali kontrolo s topilom) se izberejo najmanj tri roženice, katerih motnjava je blizu povprečni motnjavi vseh roženic. Preostale roženice se nato razdelijo na skupino za nadaljnje testiranje in skupino za pozitivne kontrole.
23. Ker je toplotna kapaciteta vode večja od zraka, zagotavlja voda stabilnejše temperaturne pogoje za inkubacijo. Zato se priporoča, da se držalo za roženico in njegova vsebina hranita v vodni kopeli pri 32 ± 1 °C. Lahko se uporabljajo tudi inkubatorji za vzdrževanje temperature zraka, če zagotavljajo stabilno temperaturo (tj. s predčasnim segrevanjem držal in medijev).

Uporaba testne snovi

24. Vodita se dva različna testna protokola - eden za tekočine in površinsko aktivne snovi (trdne snovi ali tekočine) ter eden za površinsko neaktivne snovi (trdne snovi).
25. Tekočine se testirajo nerazredčene, medtem ko se površinsko aktivne snovi testirajo v 10-odstotni koncentraciji w/v in 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida, destilirani vodi ali drugem topilu, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na testni sistem. Poltrdne snovi, kreme in voski se navadno testirajo kot tekočine. Če se uporabljajo druge koncentracije raztopin, jih je treba ustrezno utemeljiti. Roženice so izpostavljene tekočinam in površinsko aktivnim snovem 10 minut. Če je čas izpostavljenosti drugačen, ga je treba ustrezno znanstveno utemeljiti.
26. Površinsko neaktivne trdne snovi se navadno testirajo kot 20-odstotne raztopine ali suspenzije v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida, destilirani vodi ali drugem topilu, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na testni sistem. V določenih okoliščinah in če je znanstveno utemeljeno, se lahko trdne snovi testirajo tudi nerazredčene z neposredno aplikacijo na površino roženice, pri čemer se uporablja odprta metoda (glej točko 29). Roženice so izpostavljene trdnim snovem štiri ure; če je znanstveno utemeljeno, se lahko tako kot pri tekočinah in površinsko aktivnih snoveh čas izpostavljenosti spremeni.
27. Uporabljajo se lahko različne testne metode, odvisno od fizikalnih in kemijskih lastnosti testne snovi (tj. trdna, tekoča, viskozna ali neviskozna tekočina). Najpomembnejše je zagotoviti, da testna snov dovolj dobro pokriva epitelno površino in da se med spiranjem ustrezno odstrani. Zaprta metoda se navadno uporablja za neviskozne do nekoliko viskozne testne snovi, medtem ko se odprta metoda navadno uporablja za polviskozne in viskozne tekoče testne tekočine in nerazredčene trdne snovi.

28. Pri zaprti metodi se prek dozirnih odprtih na zgornji površini v sprednji del držala doda toliko testne snovi (750 µL), da ta prekrije epitelno stran roženice, odprtine pa se nato za čas izpostavljenosti zatesnijo s tesnilnimi čepki. Treba je zagotoviti, da je vsaka roženica testni snovi izpostavljena dovolj dolgo.
29. Pri odprti metodi se pred testiranjem s sprednjega dela držala odstraniti obroček za zapiranje okenca in stekleno okence. Kontrolna ali testna snov (750 µL ali dovolj testne snovi, da je prekrita celotna roženica) se aplicira neposredno na epitelno površino roženice z mikropipeto. Če se testna snov težko pipetira, se lahko za lažje doziranje testno snov nanese s pipeto za neposredno izpodrivanje tlaka. Konica pipete za neposredno izpodrivanje tlaka se vstavi v dozirno konico brizgalke, da se material napolni v konico za izpodrivanje pod tlakom. Če se potisni bat počasi sprošča, se vlečni bat pipete pomakne navzgor. Če se v konici pipete začnejo tvoriti zračni mehurčki, se predmet testiranja odstrani (izvrže) in postopek ponovi, dokler konica ni polna in v njej ni zračnih mehurčkov. Po potrebi se lahko uporabi običajna brizgalka (brez igle), saj omogoča merjenje natančne količine testne snovi in lažjo aplikacijo na epitelno površino roženice. Po doziranju se na sprednji del držala ponovno namesti stekleno okence in tako ponovno ustvari zaprt sistem.

Inkubacija po izpostavljenosti

30. Po izpostavljenosti se testna snov, snov za negativno kontrolo ali snov za pozitivno kontrolo odstrani iz sprednjega dela držala, epitelij pa se najmanj trikrat (oziroma dokler testna snov ni več vidna) spere z EMEM (ki vsebuje fenol rdeče). Za spiranje se uporablja medij, ki vsebuje fenol rdeče, saj se lahko s spreminjanjem barv v fenol rdečem nadzoruje, ali je bilo spiranje kislih ali alkalnih materialov učinkovito. Če je fenol rdeče še vedno obarvano (rumeno ali vijoličasto) ali če je testna snov še vedno vidna, se roženice sperejo več kot trikrat. Ko v mediju ni več testne snovi, se roženice še zadnjič sperejo z EMEM (brez fenol rdečega). EMEM (brez fenol rdečega) se uporabi pri zadnjem spiranju, da se zagotovi, da je bilo fenol rdeče odstranjeno iz sprednjega dela držala pred merjenjem motnjave. Nato se sprednji del držala ponovno napolni s svežim EMEM brez fenol rdečega.
31. Pri tekočinah ali površinsko aktivnih snoveh se roženice po spiranju dajo v inkubator še za dve dodatni uri pri 32 ± 1 °C. V določenih okoliščinah je po izpostavljenosti koristna tudi daljša inkubacija, vendar je to odvisno od vsakega posameznega primera. Roženice, ki se testirajo s trdnimi snovmi, se po štirih urah izpostavljenosti temeljito sperejo, vendar pri njih nadaljnja inkubacija ni potrebna.
32. Po končani inkubaciji, ki sledi izpostavljenosti (pri tekočinah in površinsko aktivnih snoveh), oziroma po koncu štiriurne izpostavljenosti (pri površinsko neaktivnih trdnih snoveh) se zabeleži motnjava in prepustnost vsake roženice. Poleg tega se vsaka roženica pregleda vizualno in zabeležijo vsa pomembnejša opažanja (npr. lupljenje tkiva, prisotnost preostale testne snovi, neenotni vzorci motnjave). Ta opažanja so lahko pomembna, saj se lahko odražajo v odklonih, ki jih izmeri opacitometer.

Kontrolne snovi

33. Vsak poskus vključuje primerjalno negativno kontrolo ali kontrolo s topilom/vehiklom ter pozitivno kontrolo.
34. Pri testiranju 100-odstotne tekoče snovi se v testno metodo BCOP vključi primerjalna negativna kontrola (npr. 0,9-odstotna raztopina natrijevega klorida ali destilirane vode), da se ugotovijo nespecifične spremembe testnega sistema in zagotovijo izhodiščne vrednosti za končne točke preskusa. Ta kontrola tudi zagotavlja, da preskusni pogoji ne povzročajo dražilnih reakcij.
35. Pri testiranju razredčene tekočine, površinsko aktivne ali trdne snovi se v testno metodo BCOP vključi primerjalna kontrolna skupina s topilom/vehiklom, da se ugotovijo nespecifične spremembe testnega sistema in zagotovijo izhodiščne vrednosti za končne točke preskusa. Uporablja se lahko samo topilo/vehikel, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na testni sistem.
36. Pri vsakem poskusu se kot primerjalna pozitivna kontrola vključi tudi znana dražilna snov za oči, da se zagotovi, da se sproži zelena reakcija. Ker se pri tej testni metodi preskus BCOP uporablja za ugotavljanje jedkih ali zelo dražilnih snovi za oči, mora biti referenčna snov pri pozitivni kontroli snov, ki pri tej testni metodi povzroči močno reakcijo. Da se zagotovi, da se odkloni pri reakcijah pozitivne kontrole ocenjujejo v daljšem obdobju, stopnja dražilnega učinka ne sme biti prevelika.
37. Primera pozitivnih kontrol za tekoče testne snovi sta dimetilformamid ali 1-odstoten natrijev hidroksid. Primer pozitivne kontrole za trdno testno snov je 20-odstoten w/v imidazol v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida.

38. Primerjalne snovi so primerne za ocenjevanje potencialnih dražilnih učinkov, ki jih imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda na oči, ali za ocenjevanje relativnega potencialnega draženja dražilne snovi za oko v določenem razponu dražilnih reakcij.

Merjene končne točke

39. Motnjava je odvisna od količine svetlobe, ki prodre skozi roženico. Motnjava roženice se meri kvantitativno s pomočjo opacitometra, pri čemer se meri neprekinjeno.
40. Prepustnost je odvisna od količine barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi vse celične sloje roženice (tj. od epitelija na zunanji površini roženice do endotelija na notranji površini roženice). V sprednji del držala za roženico, na katerega je pripeta epitelna stran roženice, se doda 1 mL raztopine natrijevega fluoresceina (4 ali 5 mg/mL pri testiranju tekočin in površinsko aktivnih snovi oziroma površinsko neaktivnih snovi), medtem ko se zadnji del držala, na katerega je pripeta endotelna stran roženice, napolni s svežim EMEM. Držalo se nato da v inkubator v vodoravnem položaju za 90 ± 5 minut pri 32 ± 1 °C. Količina natrijevega fluoresceina, ki prodre v zadnji del držala, se meri kvantitativno s pomočjo spektrofotometrije UV/VIS. Spektrofotometrične meritve pri 490 nm se beležijo kot neprekinjeno merjene vrednosti optične gostote (OD_{490}) ali absorbance. Prepustnost fluoresceina se določa z vrednostmi OD_{490} , ki so bile izmerjene s spektrofotometrom vidne svetlobe pri standardni dolžini poti 1 cm.
41. Namesto spektrofotometra se lahko uporablja tudi čitalac 96-mestnih mikrotiterskih plošč, pod pogojem, da: (i) se lahko določi linearno merilno območje čitalca za določevanje vrednosti fluoresceina OD_{490} in (ii) če se v 96-mestni mikrotiterski plošči uporablja dovolj veliko vzorcev fluoresceina, da se zagotovijo vrednosti OD_{490} , ki ustrezajo standardni dolžini poti 1 cm (za to so lahko potrebne popolnoma napolnjene posode [navadno 360 μ L]).

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

42. Po korigiranju vrednosti motnjave in povprečne prepustnosti (OD_{490}) za vrednosti ozadja za motnjavo in vrednosti prepustnosti negativne kontrole OD_{490} se vrednosti povprečne motnjave in prepustnosti OD_{490} za vsako testno skupino združijo v empirično izpeljani formuli, s katero se izračuna vrednost draženja *in vitro* (IVIS) za vsako testno skupino, kot sledi:

$$IVIS = \text{povprečna vrednost motnjave} + (15 \times \text{povprečna vrednost prepustnosti } OD_{490})$$

Po *Sini et al.* (16) je bila ta formula izpeljana na podlagi laboratorijskih in medlaboratorijskih študij. Podatki, zbrani med multilaboratorijsko študijo za 36 spojin, so bili ocenjeni z multivariantno analizo, s katero se je določila najustreznejša enačba za primerjanje podatkov *in vivo* ter *in vitro*. Analizo so opravili znanstveniki dveh različnih podjetij in izpeljali skoraj identični enačbi.

43. Vrednosti motnjave in prepustnosti je treba oceniti tudi neodvisno, da se ugotovi, ali testna snov skozi eno od dveh končnih točk učinkuje jedko ali zelo dražilno (glej merila za odločanje).

Merila za odločanje

44. Snov z $IVIS \geq 55,1$ velja za jedko ali zelo dražilno snov. Kot je navedeno pod točko 1, je treba testno snov, ki ni opredeljena kot jedka ali zelo dražilna za oči, zaradi razvrščanja in označevanja dodatno testirati. V primerjavi s podatki testne metode *in vivo* na očeh zajcev, razvrščenih po sistemih za razvrščanje EPA (1), EU (2) ali GHS (3), je splošna natančnost testne metode BCOP 79-odstotna (113/143) do 81-odstotna (119/147), delež lažno pozitivnih rezultatov 19-odstoten (20/103) do 21-odstoten (22/103) ter delež lažno negativnih rezultatov 16-odstoten (7/43) do 25-odstoten (10/40). Če se iz podatkovne zbirke izključijo snovi določenega kemijskega (npr. alkoholi, ketoni) ali fizikalnega razreda, je natančnost testa BCOP po sistemih za razvrščanje EU, EPA in GHS 87-odstotna (72/83) do 92-odstotna (78/85), delež lažno pozitivnih rezultatov 12-odstoten (7/58) do 16-odstoten (9/56) ter delež lažno negativnih rezultatov 0-odstoten (0/27) do 12-odstoten (3/26).
45. Tudi če jedke ali zelo dražilne testne snovi za oči ni mogoče razvrstiti, so lahko podatki, pridobljeni z BCOP in testom *in vivo* na očeh zajcev ali primerno validiranim testom *in vitro*, koristni za nadaljnje ocenjevanje primernosti in omejitvev testne metode BCOP za določanje nejedkih in ne zelo dražilnih snovi (trenutno se pripravljajo smernice za uporabo testnih metod *in vitro* za ugotavljanje toksičnosti za oči).

Merila za sprejemljivost študije

46. Test se šteje za sprejemljivega, če je pri pozitivni kontroli vrednost IVIS znotraj dveh standardnih odklonov veljavne povprečne vrednosti iz preteklih testov, ki jo je treba posodobiti najmanj vsake tri mesece oziroma vedno, kadar opravljajo test laboratoriji, ki redko opravljajo teste (tj. manj kot enkrat mesečno). Reakcije negativne kontrole s topilom/vehiklom morajo dati vrednosti motnjave in prepustnosti, ki so manjše od veljavnih zgornjih omejitev vrednosti ozadja za motnjavo in prepustnosti roženic goveda, testiranih z zadevnimi negativnimi kontrolami ali kontrolami s topilom/vehiklom.

Poročilo o testu

47. V poročilu o testu je treba navesti naslednje informacije (če so pomembne za izvedbo študije):

testne in kontrolne snovi

kemijska imena in strukturno ime Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana;

registrska številka CAS (RN), če je znana;

čistost in sestava snovi ali zmesi (v težnostnih odstotkih), če so te informacije na voljo;

fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, npr. fizikalno stanje, hlapnost, pH vrednost, stabilnost, kemijski razred, topnost v vodi;

obdelava testnih/kontrolnih snovi pred testiranjem, če je pomembna (npr. segrevanje, mletje);

stabilnost, če je znana.

podatki o naročniku in testnem laboratoriju

ime in naslov naročnika, testnega laboratorija in vodje študije;

podatki o viru oči (tj. obrat, v katerem so bili odvzeti);

pogoji za hrambo in prevoz oči (tj. dan in čas odvzema oči, čas pred prvim testiranjem, prevozna sredstva in temperaturni pogoji, morebitno uporabljeni antibiotiki);

posebne lastnosti živali, katerim so bili odvzete oči, če so znane (tj. starost, spol, teža živali donatorke).

*utemeljitev testne metode in uporabljenega protokola**celovitost testne metode*

postopek za zagotavljanje celovitosti (tj. natančnosti in zanesljivosti) testne metode v daljšem časovnem obdobju (npr. redno testiranje snovi za preverjanje sposobnosti, uporaba podatkov o negativni in pozitivni kontroli iz preteklih testov).

merila za sprejemljivost testa

sprejemljiva primerjalna pozitivna in negativna kontrola na podlagi podatkov iz preteklih testov;

sprejemljiva primerjalna pozitivna in negativna kontrola na podlagi podatkov iz preteklih testov.

testni pogoji

opis uporabljenega testnega sistema;

vrsta uporabljenega držala za roženico;

podatki o kalibriranju naprav za merjenje motnjave in prepustnosti (npr. opacitometer in spektrofotometer);

podatki o uporabljenih roženicah goveda, vključno z izjavami o njihovi kakovosti;

podrobnosti o uporabljenem testnem postopku;

uporabljene koncentracije testne snovi;

opis vseh sprememb testnega postopka;

sklic na modelne podatke iz preteklih testov (tj. negativna in pozitivna kontrola, snovi za preverjanje sposobnosti, primerjalne snovi);

opis uporabljenih meril za ocenjevanje.

rezultati

tabele s podatki iz posameznih testnih vzorcev (npr. vrednosti motnjave in OD₄₉₀ ter izračunane vrednosti IVIS za testno snov ter pozitivne, negativne in primerjalne kontrole [če so bile upoštevane], vključno s podatki iz ponovitev poskusa v dvojniku, če so bile opravljene, ter povprečne vrednosti \pm standardni odklon pri vsakem poskusu);

opis drugih opaženih učinkov;

razprava o rezultatih

sklepne ugotovitve.

LITERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Available:

[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. Available:

[<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. Available:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- (6) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available:

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

Dodatek 1

OPREDELITVE

Natančnost: stopnja ujemanja testnih rezultatov s priznanimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti testne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata in pomenita delež pravilnih rezultatov testne metode.

Primerjalna snov: snov, ki se uporablja kot standard za primerjavo s testno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom testiranih snovi; (iii) znane fizikalne/kemijske lastnosti; (iv) spremni podatki o znanih učinkih in (v) znana potenca v razponu zelene reakcije.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

Motnjava roženice: merjenje stopnje motnjave roženice po izpostavljenosti testni snovi. Povečana motnjava roženice pomeni, da je roženica poškodovana. Motnjava se lahko ocenjuje subjektivno kot pri Dreizovem testu na očeh zajcev ali objektivno z instrumentom, kot je „opacitometer“.

Prepustnost roženice: kvantitativna vrednost poškodovanega epitelija roženice, izmerjena z določanjem količine barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi vse celične plasti roženice.

EPA kategorija 1: jedka snov (ireverzibilno uničenje očesnega tkiva), ki poškoduje ali draži roženico več kot 21 dni (1).

EU kategorija R41: poškodba očesnega tkiva ali resno fizično poslabšanje vida po aplikaciji testne snovi na sprednjo površino očesa, ki po 21 dneh aplikacije ni popolnoma reverzibilna (2).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih snovi, ki jih testna metoda prikaže kot lažno negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti testne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih snovi, ki jih testna metoda prikaže kot lažno negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti testne metode.

GHS (Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) s pomočjo standardiziranih vrst in stopenj fizikalnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za označevanje z npr. piktogrami, opozorilnimi besedami, izjavami o nevarnosti, varnostnimi izjavami in varnostnimi listi z namenom razširjanja informacij o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščite ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolja (3).

GHS kategorija 1: poškodba očesnega tkiva ali resno fizično poslabšanje vida po aplikaciji testne snovi na sprednjo površino očesa, ki po 21 dneh aplikacije ni popolnoma reverzibilna (3).

Nevarnost: neločljiva lastnost snovi ali stanja, ki lahko ob izpostavljenosti tej snovi škodljivo učinkuje na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Vrednost draženja *in vitro* (IVIS): empirično izpeljana formula, ki se uporablja pri testu BCOP, pri kateri se povprečne vrednosti motnjave in prepustnosti za vsako testno skupino združijo v eno samo vrednost *in vitro* za vsako testno skupino. $IVIS = \text{povprečna vrednost motnjave} + (15 \times \text{povprečna vrednost prepustnosti})$.

Negativna kontrola: netestirani dvojnik, ki vsebuje vse komponente testnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, testiranimi s testno snovjo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s testnim sistemom.

Nedražilna snov: snovi, ki niso razvrščene v EPA kategorije I, II ali III; EU kategoriji R41 ali R36 ali GHS kategorije 1, 2A ali 2B dražilnih snovi za oči.

Jedka snovi za oči: (a) snov, ki povzroča ireverzibilno poškodbo očesnega tkiva; (b) snovi, ki so razvrščene v GHS kategorijo 1, EPA kategorijo I ali EU kategorijo R41 dražilnih snovi za oči (1) (2) (3).

Dražilna snov za oči: (a) snov, ki po aplikaciji na sprednjo površino očesa povzroči reverzibilno poškodbo očesa; (b) snovi, ki so razvrščene v EPA kategoriji II ali III, EU kategorijo R36 ali GHS kategoriji 2A ali 2B dražilnih snovi za oči (1) (2) (3).

Zelo dražilna snov za oči: (a) snov, ki po aplikaciji na sprednjo površino očesa povzroči poškodbo tkiva, ki po 21 dneh po aplikaciji ne izgine oziroma resno fizično poslabša vid; (b) snovi, ki so razvrščene v GHS kategorijo 1, EPA kategorijo I ali EU kategorijo R41 dražilnih snovi za oči (1) (2) (3).

Opacitometer: inštrument za merjenje motnjave roženice, ki kvantitativno ocenjuje prenos svetlobe skozi roženico. Navadno ima dva dela, ki imata vsak svoj vir svetlobe in fotocelico. En del se uporablja za testirano roženico, drugi za kalibriranje in nastavitve inštrumenta na vrednost nič. Svetloba halogene svetilke se skozi kontrolni del (prazen del brez okenc ali tekočine) usmeri v fotocelico in primerja s svetlobo, usmerjeno v fotocelico skozi testni del, v katerem je del z roženico. Primerja se razlika v preneseni svetlobi iz fotocelic, na digitalnem ekranu pa se prikaže numerična vrednost motnjave.

Pozitivna kontrola: dvojniki, ki vsebuje vse komponente testnega sistema in se testira s snovjo, za katero je znano, da sproži pozitivno reakcijo. Da se zagotovi, da se odkloni pri reakciji pozitivne kontrole ocenjujejo v daljšem časovnem obdobju, stopnja reakcije ne sme biti prevelika.

Zanesljivost: stopnja reproduktivnosti testne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Oцени se z izračunom laboratorijske in medlaboratorijske reproduktivnosti in ponovljivosti.

Kontrola s topilom/vehiklom: netestirani vzorec, ki vsebuje vse komponente testnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela z vzorci, testiranimi s testno snovjo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščna reakcija za vzorce, testirane s testno snovjo in raztopljene v istem topilu ali vehiklu. Pri testiranju s primerjalno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo oziroma vehikel reagira s testnim sistemom.

Stopenjsko testiranje: stopenjska testna strategija, pri kateri se v posebnem vrstnem redu pregledajo vse informacije o testni snovi, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi teža dokazov, da se določi, ali je na voljo dovolj informacij za razvrstitev snovi med nevarne snovi, preden se preide na naslednjo stopnjo. Če se lahko na podlagi razpoložljivih informacij določi potencialno draženje snovi, dodatno testiranje ni potrebno. Če na podlagi razpoložljivih informacij potencialnega draženja testne snovi ni mogoče določiti, se opravi postopno sekvenčno testiranje na živalih, dokler ni mogoča jasna razvrstitev.

Validirana testna metoda: testna metoda, za katero sta bili na podlagi validacijskih študij določeni primernost (vključno z natančnostjo) in zanesljivost za določen namen. Treba je opozoriti, da natančnost in zanesljivost validirane testne metode nista nujno zadostni, da bi bili sprejemljivi za predlagani namen.

Teža dokazov: proces preučevanja prednosti in slabosti različnih informacij z namenom sprejetja zaključka o potencialni nevarnosti snovi in njegovi utemeljitvi.

Dodatek 2

Snovi za preverjanje usposobljenosti za testno metodo BCOP

Preden lahko začnejo laboratoriji redno uporabljati testno metodo, ki izpolnjuje zahteve te testne metode, morajo dokazati tehnično usposobljenost tako, da deset priporočenih snovi iz tabele 1 pravilno razvrstijo glede na njihov dražilni učinek na oči. Te snovi so bile izbrane, ker predstavljajo razpon reakcij lokalnega draženja/razjedanja očesa, ki temelji na rezultatih testa *in vivo* na očeh zajcev (TG 405) (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali snovi, ki niso razvrščene in označene v skladu z UN GHS (3) (7)). Vendar se lahko zaradi validirane primernosti teh preskusov (tj. izključno za določevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči) usposobljenost dokaže samo z dvema testnima rezultatoma, na podlagi katerih je mogoča razvrstitev (jedka/zelo dražilna snov ali nejedka/nedražilna snov). Druga merila za izbor snovi so bila, da so te dostopne na trgu, da so na voljo visokokakovostni referenčni podatki *in vivo* in visokokakovostni podatki, pridobljeni z dvema metodama *in vitro*, za kateri se pripravljajo smernice. Zaradi tega so bile dražilne snovi izbrane iz priporočenega seznama ICCVAM, ki vsebuje 122 referenčnih snovi za validacijo testnih metod *in vitro* za ugotavljanje toksičnosti za oči (glej dodatek H: ICCVAM - Priporočene referenčne snovi) (5). Referenčni podatki so zbrani v dokumentih ICCVAM o pregledu ozadja testne metode BCOP in testne metode ICE na izoliranih očeh piščancev (17) (18).

Tabela 1

Priporočene snovi za ugotavljanje tehnične usposobljenosti za BCOP

Snov	Št. CAS	Kemijski ⁽¹⁾ razred	Fizikalna oblika	Razvrstitev <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Razvrstitev <i>in vitro</i> ⁽³⁾
benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	onijska spojina	tekoča	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
klorheksidin	55-56-1	amin, amidin	trdna	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
dibenzoil-L-vinska kislina	2743-38-6	karboksilna kislina, ester	trdna	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
imidazol	288-32-4	heterociklična spojina	trdna	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
trikloroocetna kislina (30 %)	76-03-9	karboksilna kislina	tekoča	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	kislinski halid	tekoča	kategorija 2A	nejedka/lažje dražilna snov
etil-2-metil acetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekoča	kategorija 2B	nejedka/lažje dražilna snov
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna	kategorija 2A	nejedka/lažje dražilna snov
glicerol	56-81-5	alkohol	tekoča	ni oznake	nejedka/lažje dražilna snov
n-heksan	110-54-3	ogljikovodik (aciklični)	tekoča	ni oznake	nejedka/lažje dražilna snov

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS)

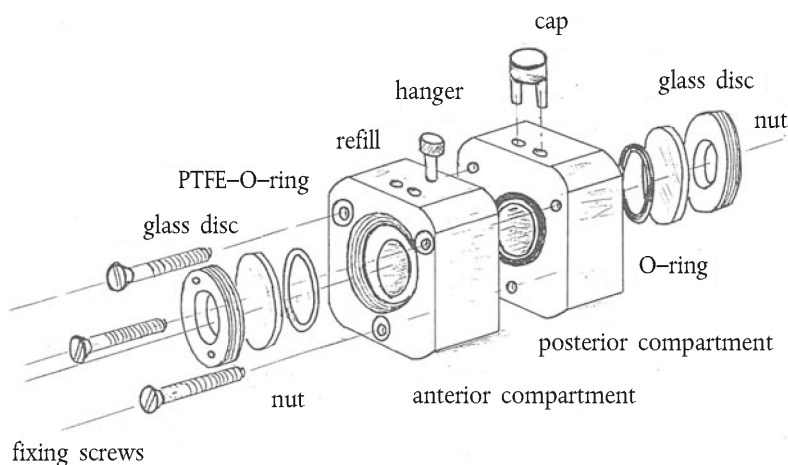
⁽¹⁾ Kemijski razredi so bili dodeljeni za vsako testno snov s standardnim sistemom za razvrščanje, ki temelji na sistemu MeSH (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Na podlagi rezultatov, pridobljenih s testom *in vivo* na očeh zajcev (OECD TG 405), in ob upoštevanju UN GHS (3)(7).⁽³⁾ Na podlagi rezultatov BCOP in ICE.

Dodatek 3

DRŽALO ZA ROŽENICO ZA DOLOČANJE BCOP

1. Držala za roženico za BCOP so narejena iz intertnega materiala (npr. polipropilena). Sestavljena so iz dveh polovic (sprednjega in zadnjega dela) in dveh podobnih cilindričnih notranjih posodic. Prostornina vsake posodice je 5 mL in se konča s steklenim okencem, skozi katerega se beležijo vrednosti motnjave. Premer notranjih posodic je 1,7 cm, globina pa 2,2 cm ⁽¹⁾. Tesnilni obroček na zadnjem delu držala preprečuje uhajanje. Roženice se z endotelno stranjo navzdol položijo na tesnilni obroček zadnjega dela držala, sprednji del držala pa se položi na epitelno stran roženice. Oba dela držala sta pritrjena s tremi vijaki iz nerjavečega materiala na zunanjih robovih vsakega dela. Na koncu vsakega dela držala je stekleno okence, ki se lahko odstrani za lažji dostop do roženice. Med steklenim okencem in delom držala je tesnilni obroček, ki preprečuje uhajanje. Skozi luknjici na vrhu vsakega dela držala se vnašajo in odstranjujejo medij in testne snovi. Med testiranjem in inkubacijo sta oba dela držala zaprta z gumijastimi čepki.

⁽¹⁾ Navedene dimenzije se nanašajo na držala za roženico, ki se uporabljajo pri kravah, starih od 12 do 60 mesecev. Za uporabo pri živalih, starih od šest do 12 mesecev, bi moralo biti držalo zasnovano tako, da bi bila prostornina vsakega dela 4 mL, premer obeh notranjih delov 1,5 cm in njuna globina 2,2 cm. Pri vsakem novo zasnovanem držalu za roženico je pomembno, da je razmerje med izpostavljenostjo površini roženice in prostornino zadnjega dela enako razmerju pri običajnih držalih za roženico. Tako se zagotovi, da se pravilno določijo vrednosti prepustnosti za izračun IVIS s predlagano formulo.



Glosar

Glass disc: steklena ploščica

PTFE-O-ring: tesnilni obroček PTFE

Refill: odprtina za polnjenje

Hanger: povezovalni element

Cap: čepek

Nut: varovalni obroček

O-ring: tesnilni obroček

Posterior compartment: zadnji del držala

Anterior compartment: sprednji del držala

Fixing screws: pritrdilni vijaki

OPACITOMETER

2. Opacitometer je naprava, ki meri prenos svetlobe. Svetloba halogene svetilke se skozi kontrolni del (prazen del brez okenc ali tekočine) usmeri v fotocelico in primerja s svetlobo, usmerjeno v fotocelico skozi testni del, v katerem je del z roženico. Nato se primerja razlika v svetlobi, ki se prenese iz fotocelic, na digitalnem ekranu pa se prikaže numerična vrednost motnjave. Enote motnjave so že določene.
3. Opacitometer naj bi prek izmerjenih vrednosti motnjave zagotovil linearno reakcijo, ki ustreza mejnim vrednostim, ki se uporabljajo v različnih sistemih za razvrščanje, opisanih v modelu za prognosticiranje (tj. do mejne vrednosti, ki določa jedkost/močno dražilnost). Da bodo izmerjene vrednosti do 75–80 enot motnjave linearne in natančne, je treba opacitometer kalibrirati s kalibratorji. Kalibratorji (neprepustne poliesterske folije) se namestijo v kalibracijski del (del za roženico, zasnovan posebej za kalibratorje) in beležijo na opacitometru. Kalibracijski del je zasnovan tako, da je oddaljenost kalibratorjev med svetlobo in fotocelico približno enaka kot oddaljenost roženic med merjenjem prepustnosti. Opacitometer se najprej kalibrira na 0 enot motnjave, pri čemer se uporablja kalibracijski del brez kalibratorja. Nato se tri različni kalibratorji en za drugim namestijo v kalibracijski del ter se meri prepustnost. Kalibratorji 1, 2 in 3 naj bi zagotovili vrednosti prepustnosti, ki ustrezajo vnaprej določenim vrednostim 75, 150 oziroma 225 enot motnjave $\pm 5\%$.

B. 48 TESTNA METODA NA IZOLIRANIH OČEH PIŠČANCEV ZA UGOTAVLJANJE JEDKIH IN ZELO DRAŽILNIH SNOVI ZA OČI (ICE)

UVOD

1. Testna metoda na izoliranih očeh piščancev (ICE) je testna metoda *in vitro*, ki se pod določenimi pogoji in z določenimi omejitvami uporablja za razvrščanje snovi in zmesi med jedke in zelo dražilne za oči (1) (2) (3). V tej testni metodi so zelo dražilne snovi tiste snovi, ki povzročajo poškodbe oči, ki se pri zajcu ohranijo najmanj 21 dni po aplikaciji. Čeprav testa *in vivo* na očeh zajcev ne more nadomestiti popolnoma, se test ICE priporoča kot del stopenjske testne strategije za regulativno razvrščanje in označevanje za posebna področja uporabe (4) (5). Testne snovi in zmesi (6), ki v tem preskusu dajo pozitiven rezultat, se lahko razvrstijo med jedke ali zelo dražilne snovi za oči, ne da bi bilo potrebno opraviti dodatno testiranje na zajcih. Snov z negativnim rezultatom testa bi bilo treba testirati na zajcih s pomočjo sekvenčne testne strategije, ki je določena v preskusni smernici OECD 405 (7) (poglavje B. 5 te priloge).
2. V tej testni metodi so opisani postopki za oceno potencialne jedkosti in močne dražilnosti testne snovi za oči glede na njeno sposobnost, da v izoliranem očesu piščanca povzroča toksičnost. Toksični učinki na roženico se merijo z: (i) kvalitativnim ocenjevanjem motnjave, (ii) kvalitativnim ocenjevanjem poškodbe epitelija po aplikaciji fluoresceina (zadrževanje fluoresceina), (iii) kvantitativnim ocenjevanjem povečane debeline (nabreklosti) in (iv) kvantitativnim ocenjevanjem makroskopske morfološke poškodbe na površini. Motnjava roženice, nabreklost in ocenjevanje poškodb po izpostavljenosti testni snovi se najprej ocenijo posamično in nato združijo, da se lahko določi stopnja dražilnosti očesa.
3. S testno metodo ICE so bile testirane tudi dražilne snovi, ki povzročajo poškodbe oči, ki izginejo v manj kot 21 dneh, in nedražilne snovi. Vendar natančnost in zanesljivost testne metode ICE pri snoveh iz teh dveh kategorij nista bili ocenjeni formalno.
4. Opredelitve so navedene v dodatku 1.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

5. Ta testna metoda temelji na protokolu (8) testne metode ICE Medagencijskega usklajevalnega odbora za validacijo alternativnih metod (ICCVAM), ki je bil pripravljen po mednarodni študiji o validaciji (4)(5)(9), pri kateri so sodelovali Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), Japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) ter Oddelek za toksikologijo in uporabno farmakologijo nizozemskega Inštituta za raziskave TNO. Protokol temelji na informacijah iz objavljenih protokolov ter protokolu, ki ga uporablja TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. Opredeljene omejitve za to testno metodo temeljijo na visokem številu lažno pozitivnih rezultatov za alkohole ter visokem številu lažno negativnih rezultatov za trdne in površinsko aktivne snovi (glej točko 47) (4). Če se snovi iz teh kemijskih in fizikalnih razredov izključijo iz podatkovne zbirke, se natančnost ICE v sistemih za razvrščanje EU, EPA in GHS bistveno izboljša (4). Pri tem preskusu (tj. za ugotavljanje izključno jedkih in zelo dražilnih snovi za oči) lažno negativni rezultati niso kritični, saj bi se take snovi nato preskušale na zajcih ali, odvisno od regulativnih zahtev, z drugimi ustrezno potrjenimi testi *in vitro*, pri katerih se uporablja sekvenčna testna strategija, ki temelji na teži dokazov. Poleg tega nekaterih kemijskih ali proizvodnih razredov (npr. zmesi) s trenutno validacijsko podatkovno zbirko ni bilo mogoče ustrezno oceniti. Vendar pa bi lahko preskuševalci to testno metodo uporabili pri vseh vrstah testnega materiala (tudi pri zmeseh), pri čemer bi bil pozitiven rezultat sprejemljiv kot indikator za jedko ali zelo dražilno snov za oči. Pozitivne rezultate, pridobljene z uporabo alkoholov, je treba razlagati previdno, saj obstaja tveganje, da so vanje vključeni tudi lažno pozitivni rezultati.
7. Pri vseh postopkih na očesih piščancev je treba upoštevati veljavna pravila in postopke testnega urada o ravnanju s človeškim ali živalskim materialom, kamor spadajo med drugim tudi tkiva in tkivne tekočine. Priporočajo se splošni previdnostni ukrepi za laboratorije (15).
8. Čeprav testna metoda upošteva nekatere učinke na očesa, ocenjene s testno metodo za ugotavljanje dražilnih snovi na očeh zajcev, in do določene mere tudi njihovo resnost, je kljub temu omejena, saj ne upošteva poškodb veznice in šarenice. Čeprav tudi same reverzibilnosti poškodb roženice s testom ICE ni mogoče oceniti, je bilo na podlagi študij na očeh zajcev kljub temu predlagano, da se oceni prvotna globina poškodbe roženice ter tako razlikuje med ireverzibilnimi in reverzibilnimi učinki (16). Treba je tudi opozoriti, da s testno metodo ICE ni mogoče oceniti potencialne sistemske toksičnosti, povezane z izpostavljenostjo oči.
9. Trenutno potekajo prizadevanja za nadaljnjo karakterizacijo uporabnosti in omejitev testne metode ICE za ugotavljanje lažje dražilnih in nedražilnih snovi (glej tudi točko 48). Uporabnikom se priporoča, da organizacijam za validacijo zagotovijo vzorce in/ali podatke za uradno oceno morebitnih prihodnjih uporab testne metode ICE, vključno za ugotavljanje lažje dražilnih ali nedražilnih snovi za oči.

10. Laboratoriji, ki ta preskus opravljajo prvič, morajo uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz dodatka 2. Te kemikalije uporabijo, da dokažejo, da so tehnično sposobni izvajati testno metodo ICE, preden podatke o testu ICE predložijo za regulativno razvrstitev nevarnosti.

NAČELO TESTA

11. Testna metoda ICE je organotipski model, ki zagotavlja kratkoročno ohranjanje piščančjega očesa v *in vitro*. Pri tej testni metodi se poškodba, ki jo povzroči testna snov, oceni tako, da se določijo nabreklost roženice, njena prepustnost in zadrževanje fluoresceina. Medtem ko se zadnja parametra ocenjujeta kvalitativno, je treba nabreklost roženice oceniti kvantitativno. Vsaka meritev se pretvori v kvantitativen rezultat, ki se uporabi za izračun splošnega indeksa dražilnosti, ali pa se ji dodeli kvalitativna kategorija, ki se uporablja za razred jedkosti in močne dražilnosti za oči *in vitro*. Oba rezultata se lahko nato uporabita za predvidevanje jedkosti in močne dražilnosti testne snovi za oči *in vivo* (glej merila za odločanje).

Izvor in starost oči piščancev

12. Za ta preskus se običajno uporabljajo oči piščancev, ki so bili zaklani v klavnicah in namenjeni za človeško prehrano, kar pomeni, da poskusne živali niso potrebne. Uporabljajo se samo oči zdravih živali, primernih za vstop v prehransko verigo.
13. Čeprav kontrolirana študija za ocenjevanje najprimernejše starosti piščancev ni bila opravljena, se pri tej testni metodi uporabljajo mladi piščanci, ki so bili zaklani v klavnicah (tj. piščanci, stari približno sedem tednov in težki od 1,5–2,5 kg).

Odvzem in prevoz oči v laboratorij

14. Glave se odstranijo neposredno po omamljanju piščancev, običajno z električnim šokom, in po izkrvavitvi zaradi prereza vratu. Piščanci se morajo nahajati v bližini laboratorija, tako da se njihove glave iz klavnice v laboratorij pripeljejo dovolj hitro, da se njihovo stanje čim manj poslabša in/ali da ne pride do bakterijske okužbe. Čas med odvzemom oči in uporabo glav piščancev mora biti pri testni metodi ICE čim krajši (navadno dve uri) in ne sme vplivati na zanesljivost rezultatov preskusa. Ti temeljijo na merilih za izbor oči ter pozitivnih in negativnih kontrolnih reakcijah. Vsa očesa, uporabljena v preskusu, morajo pripadati isti skupini oči, odvzeti na določen dan.
15. Ker se očesa secirajo v laboratoriju, se intaktne glave iz klavnice v laboratorij prepeljejo na sobni temperaturi v plastičnih posodah in navlažene s krpami, napojenimi z izotonično fiziološko raztopino.

Merila za izbor oči za test ICE

16. Oči z močno izhodiščno obarvanostjo s fluoresceinom (tj. $> 0,5$) ali motno roženico (tj. $> 0,5$) po izolaciji se zavržejo.
17. Vsaka testna skupina in primerjalna pozitivna kontrola sta sestavljeni iz najmanj treh oči. Za negativno kontrolo ali kontrolo s topilom (če se namesto fiziološke raztopine uporablja drugo topilo) se uporabi najmanj eno oko.

POSTOPEK

Priprava oči

18. Skrbno se odstranijo veke, pri čemer je treba paziti, da se roženica ne poškoduje. Celovitost roženice se hitro oceni tako, da se na njeno površino za nekaj sekund aplicira kapljica 2-odstotnega (w/v) natrijevega fluoresceina, površina pa se nato spere z izotonično fiziološko raztopino. Oči, ki jim je bil dodan fluorescein, se nato osvetlijo s špranjsko svetilko, da se roženica ne bi poškodovala (tj. zadrževanje fluoresceina in motnjava roženice $\leq 0,5$).
19. Če je oko nepoškodovano, se izreže iz lobanje, pri čemer je treba paziti, da se roženica ne poškoduje. Zrklo se potegne iz očesne votline potegne tako, da se žmurka zagrabi s kirurškimi prijemalkami, očesne mišice pa se prerežejo z ukrivljenimi škarjami s topo konico. Tako se prepreči, da bi se roženica zaradi prevelikega tlaka poškodovala (tj. artefakti zaradi stisnjenja).
20. Ko se oko odstrani iz očesne votline, se ga mora še vedno držati viden del vidnega živca. Po odstranitvi iz očesne votline se oko položi na vpojno podlago, nato pa se odrežeta žmurka in preostalo vezno tkivo.

21. Izolirano oko se pritrdi v prijemalko iz nerjavečega materiala, pri čemer mora biti roženica v vodoravnem položaju. Prijemalka se nato prenese v komoro naprave za superfuzijo (16). Prijemalke je treba v napravi za superfuzijo namestiti tako, da je celotna roženica pokrita z izotonično fiziološko raztopino. Temperatura v komorah naprave za superfuzijo mora znašati $32 \pm 1,5$ °C. Dodatek 3 vsebuje diagram običajne naprave za superfuzijo z očesnimi prijemalkami, ki je na voljo na trgu, laboratoriji pa jo lahko izdelajo tudi sami. Naprava se lahko prilagodi potrebam posameznega laboratorija (tj. za sprejem različnega števila oči).
22. V napravi za superfuzijo se oči še enkrat pregledajo s špranjsko svetilko, da se zagotovi, da se med seciranjem niso poškodovale. Pri tem se z nastavkom za merjenje globine na špranjski svetilki na apeksu roženice izmeri tudi debelina roženice. Oči z (i) vrednostjo zadržanega fluoresceina $> 0,5$; (ii) motnjavo roženice $> 0,5$; ali (iii) dodatnimi znaki poškodb je treba zamenjati. Za oči, ki se na podlagi teh meril ne zavržejo, velja, da se kljub temu zavržejo, če debelina roženice za več kot 10 % odstopa od povprečne vrednosti vseh oči. Uporabniki morajo upoštevati, da lahko špranjske svetilke pri različnih širinah špranje za debelino roženice dajo različne merilne vrednosti. Širino špranje je treba nastaviti na 0,095 mm.
23. Po pregledu in izločitvi se oči dajo v inkubator za približno 45 do 60 minut, da se pred doziranjem ekvilibrirajo s testnim sistemom. Po ekvilibriranju se kot izhodiščna vrednost za debelino in motnjavo roženice zabeleži nična vrednost (tj. čas = 0). Vrednost fluoresceina, določena pri seciranju, se uporabi kot izhodiščna vrednost za končno točko.

Uporaba testne snovi

24. Po meritvi z ničnimi referenčnimi vrednostmi se oko (in držalo) odvzame iz naprave za superfuzijo in da v vodoravni položaj, nato pa se na roženico aplicira testna snov.
25. Tekoče testne snovi se običajno testirajo nerazredčene, lahko pa se po potrebi tudi razredčijo (tj. kot del koncepta študije). Najpogosteje se kot topilo pri razredčenih snoveh uporablja fiziološka raztopina. Pod kontrolnimi pogoji se lahko uporabljajo tudi druga topila, vendar je treba dokazati, da so primerna.
26. Tekoče testne snovi se aplicirajo na roženico tako, da je s testno snovjo enakomerno pokrita celotna površina roženice; standardna prostornina je 0,03 mL.
27. Če je mogoče, je treba trdne testne snovi čim bolj zdrobiti v terilnici s pestilom ali primerljivim orodjem za trenje. Prašek se aplicira na roženico tako, da je njena površina enakomerno pokrita s testno snovjo; standardna količina je 0,03 g.
28. Testna snov (tekoča ali trdna) se pusti učinkovati 10 sekund, nato pa se spere z očesa s fiziološko raztopino (približno 20 mL) pri sobni temperaturi. Oko (in držalo) se nato ponovno da v napravo za superfuzijo v prvotnem pokončnem položaju.

Kontrolne snovi

29. Vsak poskus vključuje primerjalno negativno kontrolo ali kontrolo s topilom/vehiklom ter pozitivne kontrole.
30. Pri testiranju 100-odstotnih tekočin ali trdnih snovi se kot primerjalna negativna kontrola pri testni metodi ICE uporablja fiziološka raztopina, da se ugotovijo nespecifične spremembe testnega sistema in da preskusni pogoji ne povzročajo neustreznih dražilnih reakcij.
31. Pri testiranju razredčenih tekočin se v testno metodo vključi primerjalna kontrolna skupina s topilom/vehiklom, da se ugotovijo nespecifične spremembe testnega sistema in da preskusni pogoji ne povzročajo dražilnih reakcij. Kot je navedeno v točki 25, se lahko uporablja samo topilo/vehikel, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na testni sistem.

32. Pri vsakem poskusu se kot primerjalna pozitivna kontrola vključi tudi znana dražilna snov za oči, da se zagotovi, da se sproži zelena reakcija. Ker se pri tej testni metodi preskus ICE uporablja za ugotavljanje jedkih ali zelo dražilnih snovi, mora biti referenčna snov pri pozitivni kontroli snov, ki pri tej testni metodi povzroči močno reakcijo. Da se zagotovi, da se odkloni pri reakciji pozitivne kontrole ocenjujejo v daljšem časovnem obdobju, stopnja močne reakcije ne sme biti prevelika. Za pozitivno kontrolo je treba zbrati dovolj podatkov o *in vitro*, da se lahko izračuna statistično določen sprejemljiv razpon pozitivne kontrole. Če za določeno pozitivno kontrolo ni na voljo ustreznih podatkov o testni metodi ICE iz preteklosti, je treba opraviti študije, v katerih se bodo ti podatki zbrali.
33. Primera pozitivnih kontrol za tekoče testne snovi sta 10-odstotna očetna kislina ali 5-odstoten benzalkonijev klorid, primera pozitivnih kontrol za trdne testne snovi pa natrijev hidroksid in imidazol.
34. Primerjalne snovi so primerne za ocenjevanje potencialnih dražilnih učinkov, ki jih imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda na oči, ali za ocenjevanje relativnega potencialnega draženja dražilne snovi za oko v določenem razponu dražilnih učinkov.

Merjene končne točke

35. Testirane roženice se ocenijo pred testiranjem in nato 30, 75, 120, 180 in 240 minut (± 5 minut) po spiranju, ki se opravi po testiranju. Ti časovni intervali omogočajo ustrezno število meritev med štiriurnim testiranjem in zagotavljajo dovolj časa, da se oči med posameznimi meritvami ustrezno pregledajo.
36. Končne točke, ki se ocenijo, so motnjava roženice, nabreklost, zadrževanje fluoresceina in morfološki učinki (tj. luknjičast ali odstopljen epitelij). Vse končne točke razen zadrževanja fluoresceina (ki se določi pred testiranjem in 30 minut po izpostavljenosti testni snovi) se določijo pri vsakem navedenem časovnem intervalu.
37. Priporoča se, da se motnjava roženice, zadrževanje fluoresceina, morfološki učinki in morebitni histopatološki izvidi fotografirajo.
38. Po štiriurnem pregledu je treba oči hraniti v ustrezni fiksirni raztopini (tj. v nevtralnem formalinskem pufu), da se lahko po potrebi opravi histopatološki pregled.
39. Nabreklost roženice se določi na podlagi debelin roženice, izmerjenih z optičnim pahimetrom na špranjski svetilki. Izrazi se v odstotkih in izračuna na podlagi izmerjenih debelin roženic s pomočjo naslednje formule:

$$\left(\frac{\text{debelina roženica v času } t - \text{debelina roženice v času } t = 0}{\text{debelina roženice v času } t = 0} \right) \times 100$$

40. Povprečna nabreklost roženice vseh testnih oči, izražena v odstotkih, se izračuna v vseh časovnih intervalih. Na podlagi najvišje povprečne vrednosti nabreklosti roženice, ki je bila zabeležena v vseh časovnih intervalih, se za vsako testno snov določi skupna vrednost posamezne kategorije.
41. Pri izračunu motnjave roženice se upošteva površina najbolj motne roženice. Povprečna motnjava roženice vseh testnih oči se izračuna v vseh časovnih intervalih. Na podlagi najvišje povprečne vrednosti motnjave roženice, ki je bila zabeležena v vseh časovnih obdobjih, se za vsako testno snov določi skupna vrednost za posamezno kategorijo (tabela 1).

Tabela 1
Motnjava roženice

Vrednost	Opažanja
0	roženica ni motna
0,5	roženica zelo malo motna

Vrednost	Opažanja
1	neostra in razpršena območja, deli šarenice dobro vidni
2	območje, ki prepušča svetlobo, dobro razpoznavno deli šarenice slabše vidni
3	zelo motna roženica; deli šarenice niso vidni; velikost zenice komaj razpoznavna
4	popolnoma motna roženica; šarenica ni vidna

42. Povprečna vrednost zadržanega fluoresceina se pri vseh testnih očeh izračuna samo za 30-minutno časovno obdobje in se za vsako testno snov dodeli kot skupna vrednost za posamezno kategorijo (tabela 2).

Tabela 2
Zadrževanje fluoresceina

Vrednost	Opažanja
0	brez zadržanega fluoresceina
0,5	zelo malo zadržanega fluoresceina v posameznih celicah
1	posamezne celice z nekaj fluoresceina, razdrobljene na testiranem področju roženice
2	točkaste ali zlite celice z veliko fluoresceina
3	velika zlita področja roženice, v katerih se zadržuje fluorescein

43. Morfološki učinki vključujejo ‚luknjičaste‘ epitelne celice roženice, ‚odstopljeni‘ epitelij, ‚kosmato‘ roženično površino in ‚prilepljeno‘ testno snov na roženico. Ta opažanja so lahko različno resna in se lahko pojavijo istočasno. Uvrščanje teh opažanj poteka subjektivno glede na razlago raziskovalca.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

44. Rezultate za motnjavo in nabreklost roženice ter zadrževanje fluoresceina je treba oceniti ločeno, da se ustvari razred ICE za vsako končno točko. Razredi ICE za vsako končno točko se nato združijo, da se vsaka testna snov lahko razvrsti v razred dražilnosti.

Merila za odločanje

45. Po oceni vsake končne točke se na podlagi vnaprej določenega razpona dodelijo razredi ICE. Debelina roženice (tabela 3), motnjava roženice (tabela 4) in zadrževanje fluoresceina (tabela 5) se razlagajo s pomočjo štirih razredov ICE po naslednjih lestvicah:

Tabela 3
Merila ICE za razvrstitev glede na debelino roženice

Povprečna nabreklost roženice (%) (*)	Razred ICE
0 do 5	I
> 5 do 12	II
> 12 do 18 (> 75 min po aplikaciji)	II
> 12 do 18 (≤ 75 min po aplikaciji)	III
> 18 do 26	III

Povprečna nabreklost roženice (%) (*)	Razred ICE
> 26 do 32 (> 75 min po aplikaciji)	III
> 26 to 32 (\leq 75 min po aplikaciji)	IV
> 32	IV

(*) Vrednosti za nabreklost roženice so veljavne samo, če se merijo s špranjsko svetilko tipa Haag-Streit BP900 z napravo za merjenje globine št. I in nastavljeno širino špranje $9\frac{1}{2}$, tj. 0,095 mm. Uporabniki morajo upoštevati, da lahko špranjske svetilke pri različnih širinah špranje dajo različne merilne vrednosti za debelino roženice.

Tabela 4

Merila ICE za razvrstitev motnjave roženice

Povprečna najvišja vrednost motnjave (*)	Razred ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Glej tabelo 1.

Tabela 5

Merila ICE za razvrstitev glede na povprečno vrednost zadržanega fluoresceina

Povprečna vrednost zadržanega fluoresceina po 30 minutah po aplikaciji (*)	Razred ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Glej tabelo 2.

46. Splošni razred testne snovi za dražilnost *in vitro* se določi tako, da se za razrede dražilnosti, ki ustrezajo ugotovljenim kategorijam za nabreklost in motnjavo roženice ter zadrževanje fluoresceina, uporabi formula iz tabele 6.

Tabela 6

Splošna razvrstitev za dražilnost *in vitro*

Razvrstitev	Kombinacije treh končnih točk
jedka/zelo dražilna snov	$3 \times IV$ $2 \times IV, 1 \times III$ $2 \times IV, 1 \times II$ (*) $2 \times IV, 1 \times I$ (*) motnjava roženice ≥ 3 pri 30 min (pri najmanj 2 očeh) motnjava roženice 4 pri vsakem časovnem intervalu (pri najmanj 2 očeh) močno odstopljen epitelij (pri najmanj enem očesu)

(*) manj pogoste kombinacije

47. Kot je navedeno v prvem odstavku, je treba testno snov, ki ni opredeljena kot jedka ali zelo dražilna za oči, zaradi razvrščanja in označevanja dodatno testirati. V primerjavi s podatki testne metode *in vivo* na očeh zajcev za določanje jedkih ali zelo dražilnih snovi za oči, razvrščenih po EPA (1), EU (2) ali GHS (3), je splošna natančnost testne metode ICE 83-odstotna (120/144) do 87-odstotna (134/154), delež lažno pozitivnih rezultatov 6-odstoten (7/122) do 8-odstoten (9/116) ter delež lažno negativnih rezultatov 41-odstoten (13/32) do 50-odstoten (15/30). Če se iz podatkovne zbirke izključijo snovi nekaterih kemijskih (npr. alkoholi, ketoni) ali fizikalnih razredov (npr. trdne snovi), je natančnost testa ICE po sistemih za razvrščanje EU, EPA in GHS 91-odstotna (75/82) do 92-odstotna (69/75), delež lažno pozitivnih rezultatov 5-odstoten (4/73) do 6-odstoten (4/70) ter delež lažno negativnih rezultatov 29-odstoten (2/7) do 33-odstoten (3/9) (4).
48. Tudi če jedke ali zelo dražilne testne snovi za oči ni mogoče razvrstiti, so lahko podatki, pridobljeni s ICE in testom *in vivo* na očeh zajcev ali primerno validiranim testom *in vitro*, koristni za nadaljnje ocenjevanje primernosti in omejitev testne metode ICE za določanje nejedkih in ne zelo dražilnih snovi (smernice za uporabo testnih metod *in vitro* za ugotavljanje toksičnosti za oči se pripravljajo).

Merila za sprejemljivost študije

49. Test se šteje za sprejemljivega, če dajo primerjalne negativne kontrole s vehiklom/topilom in primerjalne pozitivne kontrole za dražilnost vrednosti, ki spadajo v razrede nedražilnih snovi oziroma razrede zelo dražilnih/jedkih snovi.

Poročilo o testu

50. V poročilu o testu je treba navesti naslednje informacije (če so pomembne za izvedbo študije):

testne in kontrolne snovi

kemijska imena in strukturno ime Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana;

registrska številka CAS (RN), če je znana;

čistost in sestava snovi ali zmesi (v težnostnih odstotkih), če so te informacije na voljo;

fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, npr. fizikalno stanje, pH vrednost, stabilnost, kemijski razred, topnost v vodi;

obdelava testnih/kontrolnih snovi pred testiranjem, če je pomembna (npr. segrevanje, mletje);

stabilnost, če je znana.

podatki o naročniku in testnem laboratoriju

ime in naslov naročnika, testnega laboratorija in vodje študije;

podatki o viru oči (tj. obrat, v katerem so bili odvzeti);

pogoji za hrambo in prevoz oči (tj. dan in čas odvzema oči, čas pred prvim testiranjem, prevozna sredstva in temperaturni pogoji, morebitno uporabljeni antibiotiki);

posebne lastnosti živali, katerim so bili odvzete oči, če so znane (tj. starost, spol, teža živali donatorke).

utemeljitev testne metode in uporabljenega protokola

celovitost testne metode

postopek za zagotavljanje celovitosti (tj. natančnosti in zanesljivosti) testne metode v daljšem časovnem obdobju (npr. redno testiranje snovi za ugotavljanje sposobnosti, uporaba podatkov o negativni in pozitivni kontroli iz preteklih testov).

merila za sprejemljivost testa

sprejemljiva primerjalna pozitivna in negativna kontrola na podlagi podatkov iz preteklih testov.

testni pogoji

opis uporabljenega testnega sistema;

vrsta uporabljene špranjske svetilke (tj. model);

nastavitve instrumentov za uporabljeno špranjsko svetilko;

podatki o uporabljenih očeh piščancev, vključno z izjavami o njihovi kakovosti;

podrobnosti o uporabljenem testnem postopku;

uporabljene koncentracije testne snovi;

opis vseh sprememb testnega postopka;

sklic na podatke o modelu iz preteklih testov (tj. negativna in pozitivna kontrola, snovi za preverjanje sposobnosti; ugotavljanje sposobnosti, primerjalne snovi);

opis uporabljenih meril za ocenjevanje.

rezultati

opis drugih opaženih učinkov;

po potrebi slike oči;

razprava o rezultatih

sklepne ugotovitve

LITERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at:

[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. Available:

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

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

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

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

Dodatek 1

OPREDELITVE

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov testne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti testne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata in pomenita delež ustreznih rezultatov testne metode.

Primerjalna snov: snov, ki se uporablja kot standard za primerjavo s testno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom testiranih snovi; (iii) znane fizikalne/kemijske lastnosti; (iv) spremni podatki o znanih učinkih in (v) znana potencia v razponu želene reakcije.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

Motnjava roženice: merjenje stopnje motnjave roženice po izpostavljenosti testni snovi. Povečana motnjava roženice pomeni, da je roženica poškodovana.

Nabreklost roženice: objektivno merjenje pri testu ICE, da se določi občutljivost roženice po aplikaciji testne snovi. Izrazi se v odstotkih in izračuna na podlagi izhodiščnih (vrednosti pred aplikacijo) izmerjenih vrednosti debelin roženice in debelin, zabeleženih v testu ICE v rednih časovnih intervalih po aplikaciji testnega materiala. Stopnja nabreklosti roženice je indikator za poškodbo roženice.

EPA kategorija 1: jedka snov (ireverzibilno uničenje očesnega tkiva), ki prizadene ali draži roženico več kot 21 dni (1).

EU kategorija R41: poškodba očesnega tkiva ali resno fizično poslabšanje vida po aplikaciji testne snovi na sprednjo površino očesa, ki po 21 dneh aplikacije ni popolnoma reverzibilna (2).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih snovi, ki jih testna metoda prikaže kot lažno negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti testne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih snovi, ki jih testna metoda prikaže kot lažno pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti testne metode.

Zadrževanje fluoresceina: subjektivno merjenje pri testu ICE, s katerim se določi obseg zadržanega natrijevega fluoresceina v celicah epitelija po aplikaciji testne snovi. Obseg zadržanega fluoresceina je indikator za poškodbo roženičnega epitelija.

GHS (Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) s pomočjo standardiziranih vrst in stopenj fizikalnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za označevanje z npr. piktogrami, opozorilnimi besedami, izjavami o nevarnosti, varnostnimi izjavami in varnostnimi listi z namenom razširjanja informacij o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščite ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolja (3).

GHS kategorija 1: poškodba očesnega tkiva ali resno fizično poslabšanje vida po aplikaciji testne snovi na sprednjo površino očesa, ki po 21 dneh aplikacije ni popolnoma reverzibilna (3).

Nevarnost: neločljiva lastnost snovi ali stanja, ki lahko ob izpostavljenosti tej snovi škodljivo učinkuje na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Negativna kontrola: netestirani dvojniki, ki vsebuje vse komponente testnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, testiranimi s testno snovjo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s testnim sistemom.

Nedražilna snov: snovi, ki niso razvrščene v EPA kategorije I, II ali III; EU kategoriji R41 ali R36; ali GHS kategorije 1, 2A ali 2B dražilnih snovi za oči.

Jedka snovi za oči: (a) snov, ki povzroča ireverzibilno poškodbo očesnega tkiva; (b) snovi, ki so razvrščene v GHS kategorijo 1, EPA kategorijo I ali EU kategorijo R41 dražilnih snovi za oči (1) (2) (3).

Dražilna snov za oči: (a) snov, ki po aplikaciji na sprednjo površino očesa povzroča reverzibilno poškodbo očesa; (b) snovi, ki niso razvrščene v EPA kategorije I, II ali III; EU kategorija R36; ali GHS kategorijo 1, 2A ali 2B dražilnih snovi za oči.

Zelo dražilna snov za oči: (a) snov, ki po aplikaciji na sprednjo površino očesa povzroči poškodbo tkiva, ki po 21 dneh po aplikaciji ne izgine oziroma resno fizično poslabša vid; (b) snovi, ki so razvrščene v GHS kategorijo 1, EPA kategorijo I ali EU kategorijo R41 dražilnih snovi za oči (1) (2) (3).

Pozitivna kontrola: dvojniki, ki vsebuje vse komponente testnega sistema in se testira s snovjo, za katero je znano, da reagira pozitivno. Da se zagotovi, da se odkloni pri reakciji pozitivne kontrole ocenjujejo v daljšem časovnem obdobju, stopnja močne reakcije ne sme biti prevelika.

Zanesljivost: stopnja reproduktivnosti testne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom laboratorijske in medlaboratorijske reproduktivnosti in ponovljivosti.

Špranjska svetilka: inštrument, ki se uporablja za direktno preiskavo očesa in ki skupaj z binokularnim mikroskopom tvori stereomikroskop s pokončno sliko. Pri testni metodi ICE se ta inštrument uporablja za vpogled v sprednje strukture očesa piščanca ter za objektivno merjenje debeline roženice z nastavkom za merjenje globine.

Kontrola s topilom/vehiklom: netestirani vzorec, ki vsebuje vse komponente testnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, testiranimi s testno snovjo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščna reakcija za vzorce, testirane s testno snovjo in raztopljene v istem topilu ali vehiklu. Pri testiranju s primerjalno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo oziroma vehikel reagira s testnim sistemom.

Stopenjsko testiranje: stopenjska testna strategija, pri kateri se v posebnem vrstnem redu pregledajo vse informacije o testni snovi, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi teža dokazov, da se določi, ali je na voljo dovolj informacij za razvrstitev snovi med nevarne snovi, preden se preide na naslednjo stopnjo. Če se lahko na podlagi razpoložljivih informacij določi potencialno draženje snovi, dodatno testiranje ni potrebno. Če na podlagi razpoložljivih informacij potencialnega draženja testne snovi ni mogoče določiti, se opravi postopno sekvenčno testiranje na živalih, dokler ni mogoča jasna razvrstitev.

Validirana testna metoda: testna metoda, za katero sta bili na podlagi validacijskih študij določeni primernost (vključno z natančnostjo) in zanesljivost za določen namen. Treba je opozoriti, da natančnost in zanesljivost validirane testne metode nista nujno zadostni, da bi bili sprejemljivi za predlagani namen.

Teža dokazov: proces preučevanja prednosti in slabosti različnih informacij z namenom sprejetja zaključka o potencialni nevarnosti snovi in njegovi utemeljitvi.

Dodatek 2

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE SPOSOBNOSTI PRI TESTNI METODI ICE

Pređen lahko začnejo laboratoriji redno uporabljati testno metodo, ki izpolnjuje zahteve te testne metode, morajo dokazati tehnično usposobljenost tako, da deset priporočenih snovi iz tabele 1 pravilno razvrstijo glede na njihov dražilni učinek na oči. Te snovi so bile izbrane, ker predstavljajo razpon reakcij lokalnega draženja/razjedanja očesa, ki temelji na rezultatih testa *in vivo* na očeh zajcev (TG 405) (kategorije 1, 2A, 2B ali snovi, ki niso razvrščene in označene v skladu z UN GHS (3) (7)). Vendar se lahko zaradi validirane primernosti teh poskusov (tj. izključno za določevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči) usposobljenost dokaže samo z dvema testnima rezultatoma, na podlagi katerih je mogoča razvrstitev (jedka/zelo dražilna snov ali nejedka/nedražilna snov). Druga merila za izbor snovi so bila, da so te dostopne na trgu, da so na voljo visokokakovostni referenčni podatki *in vivo* in visokokakovostni podatki, pridobljeni z dvema metodama *in vitro*, za kateri se pripravljajo smernice. Zaradi tega so bile dražilne snovi izbrane iz priporočenega seznama ICCVAM, ki vsebuje 122 referenčnih snovi za validacijo testnih metod *in vitro* za ugotavljanje toksičnosti za oči (glej dodatek H: Referenčni podatki so zbrani v dokumentih ICCVAM o pregledu ozadja testne metode BCOP in testne metode ICE na izoliranih očeh piščancev (18) (19)).

Tabela 1

Priporočene snovi za ugotavljanje tehnične usposobljenosti za ICE

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Fizikalna oblika	Razvrstitev <i>in vivo</i> (2)	Razvrstitev <i>in vitro</i> (3)
benzalkonijev klorid (5 %)	8001-54-5	onijska spojina	tekoča	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
klorheksidin	55-56-1	amin, amidin	trdna	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
dibenzoil-L-vinska kislina	2743-38-6	karboksilna kislina, ester	trdna	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
imidazol	288-32-4	heterociklična spojina	trdna	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
trikloroocetna kislina (30 %)	76-03-9	karboksilna kislina	tekoča	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	kislinski halid	tekoča	kategorija 2A	nejedka/lažje dražilna snov
etil-2-metil acetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekoča	kategorija 2B	nejedka/lažje dražilna snov
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna	kategorija 2A	nejedka/lažje dražilna snov
glicerol	56-81-5	alkohol	tekoča	ni oznake	nejedka/lažje dražilna snov
n-heksan	110-54-3	ogljikovodik (aciklični)	tekoča	ni oznake	nejedka/lažje dražilna snov

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

(1) Kemijski razredi so bili dodeljeni za vsako testno snov s standardnim sistemom za razvrščanje, ki temelji na sistemu MeSH (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(2) Na podlagi rezultatov, pridobljenih s testom *in vivo* na očeh zajcev (OECD TG 405), in ob upoštevanju UN GHS (3)(7).

(3) Na podlagi rezultatov BCOP in ICE.

Dodatek 3

Diagrami naprave za superfuzijo in prijemalk za oči pri ICE

(za dodaten generičen opis naprave za superfuzijo in prijemalke za oči glej Burton et al. (17))

