

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 1152/2010**z dnia 8 grudnia 2010 r.****zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE⁽¹⁾, w szczególności jego art. 13 ust. 3,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008⁽²⁾ zawiera metody badań służące określaniu właściwości fizykochemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności substancji, które należy stosować do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006.
- (2) Należy zaktualizować rozporządzenie (WE) nr 440/2008 w celu priorytetowego uwzględnienia dwóch przyjętych przez OECD nowych metod badania *in vitro* dotyczących działania drażniącego dla oczu, aby uzyskać zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych do

celów doświadczalnych, zgodnie z dyrektywą Rady 86/609/EWG z dnia 24 listopada 1986 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych państw członkowskich dotyczących ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych⁽³⁾. W sprawie tego projektu przeprowadzono konsultacje z zainteresowanymi stronami.

- (3) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 440/2008.
- (4) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią komitetu ustanowionego na mocy art. 133 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W części B załącznika do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 dodaje się rozdziały B.47 i B.48 w brzmieniu określonym w załączniku do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 8 grudnia 2010 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

⁽¹⁾ Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Dz.U. L 142 z 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ Dz.U. L 358 z 18.12.1986, s. 1.

ZAŁĄCZNIK

„B. 47 METODA BADANIA ZMĘTNIENIA I PRZEPUSZCZALNOŚCI ROGÓWKI U BYDŁA DO CELÓW IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI ŻRĄCYCH I SILNIE DRAŻNIĄCYCH DLA OCZU

WPROWADZENIE

1. Metoda badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła (BCOP) jest metodą badania *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach w celu zaklasyfikowania substancji i mieszanin jako »żrące i silnie drażniące dla oczu« (1)(2)(3). Dla celów niniejszej metody badania substancje silnie drażniące oznaczają substancje, które wywołują zmiany oczne utrzymujące się u królika przez co najmniej 21 dni od podania tych substancji. Chociaż uważa się, że badanie BCOP nie może całkowicie zastąpić badania *in vivo* na oku królika, zaleca się jego stosowanie w ramach strategii badań wielopoziomowych do celów klasyfikacji regulacyjnej i oznakowania w ramach określonej dziedziny zastosowania (4)(5). Badane substancje i mieszaniny (6) można zaklasyfikować jako żrące lub silnie drażniące dla oczu bez przeprowadzania dodatkowych badań na królikach. Substancję, która daje ujemny wynik w badaniu, należy zbadać na królikach za pomocą strategii badań sekwencyjnych, zgodnie z wytycznymi OECD dotyczącymi badań 405 (7) (rozdział B. 5 niniejszego załącznika).
2. Niniejsza metoda badania ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania żrącego lub silnie drażniącego dla oczu badanej substancji, określanego na podstawie jej zdolności do wywoływania zmętnienia i zwiększonej przepuszczalności w izolowanej rogówce bydłowej. Toksyczne oddziaływanie na rogówkę jest oceniane na podstawie: (i) zmniejszonej przepuszczalności światła (zmętnienie) oraz (ii) zwiększonej przepuszczalności barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny (przepuszczalność). Oceny zmętnienia i przepuszczalności rogówki, wydane w następstwie ekspozycji rogówki na badaną substancję, są łączone w jeden wskaźnik podrażnienia *in vitro* (IVIS), który stosuje się do klasyfikacji stopnia działania drażniącego badanej substancji.
3. Metodę badania BCOP zastosowano również do badania substancji drażniących dla oczu wywołujących zmiany, które ustępują w ciągu 21 dni, oraz substancji niedrażniących. Dokładność i wiarygodność metody badania BCOP w odniesieniu do substancji należących do tych kategorii nie została jednak formalnie oceniona.
4. Definicje podano w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

5. Niniejsza metoda badania opiera się na protokole metody badania BCOP Międzyagencyjnego Komitetu Koordynacyjnego ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) (8), który opracowano na podstawie międzynarodowego badania walidacyjnego (4)(5)(9) przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (ECVAM) i Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (JaCVAM). Protokół opiera się na informacjach uzyskanych z instytutu badań *in vitro* (In Vitro Sciences, IIVS) oraz na protokole 124 INVITTOX (10), który został zastosowany w sponsorowanym przez Wspólnotę Europejską prewalidacyjnym badaniu BCOP przeprowadzonym w latach 1997-1998. Podstawą dla obydwu powyższych protokołów była metodologia badania BCOP, o której po raz pierwszy wspomina Gautheron i in. (11).
6. Zidentyfikowane ograniczenia niniejszej metody badania opierają się na wysokich odsetkach wyników fałszywie dodatnich w przypadku alkoholi i ketonów oraz na wysokim odsetku wyników fałszywie ujemnych w przypadku ciał stałych, które obserwuje się w bazie danych walidacyjnych (zob. pkt 44) (5). Jeżeli z bazy danych wyłączą się powyższe klasy chemiczne i fizyczne, dokładność badania BCOP w systemach klasyfikacji UE, EPA i GHS znacznie się poprawia (5). Ze względu na cel niniejszego badania (tj. zidentyfikowanie wyłącznie substancji żrących/silnie drażniących dla oczu) odsetek wyników fałszywie ujemnych nie ma decydującego znaczenia, ponieważ substancje takie zostaną następnie zbadane na królikach lub za pomocą innych odpowiednio zwalidowanych badań *in vitro*, w zależności od wymogów określonych w przepisach, przy zastosowaniu strategii badań sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Ponadto obecna baza danych walidacyjnych nie pozwala na odpowiednią ocenę niektórych klas chemicznych lub produktowych (np. mieszanin). Osoby przeprowadzające badanie mogą jednak rozważyć zastosowanie niniejszej metody badania w odniesieniu do wszystkich rodzajów badanego materiału (w tym mieszanin), w przypadku którego wynik dodatni można zaakceptować jako wskazujący na reakcję na działanie żrące lub silnie drażniące dla oczu. Dodatnie wyniki uzyskane w przypadku alkoholi i ketonów należy jednak interpretować z ostrożnością ze względu na ryzyko ich zawyżenia.
7. Wszystkie procedury przeprowadzane z wykorzystaniem oczu bydłowych i rogówki bydłowej powinny przebiegać zgodnie z regulaminami i procedurami postępowania z materiałem pozyskanym od zwierząt, który obejmuje m.in. tkanki i płyny tkankowe, obowiązującymi w placówce przeprowadzającej badanie. Zaleca się przestrzeganie ogólnych środków ostrożności dla laboratoriów (12).
8. Ograniczeniem niniejszej metody badania jest fakt, że chociaż uwzględnia się w niej niektóre skutki dla oczu oceniane przy zastosowaniu metody badania podrażnienia oczu królika i w pewnym zakresie stopień tych podrażnień, nie bierze się w niej pod uwagę uszkodzeń spojówki i tęczówki. Ponadto, chociaż w badaniu BCOP nie można ocenić odwracalności zmian w rogówce samych w sobie, zaproponowano, na podstawie badań na oku królika, możliwość zastosowania oceny początkowego stadium uszkodzenia rogówki w celu rozróżnienia między skutkami nieodwracalnymi i odwracalnymi (13). Badanie BCOP nie pozwala też na ocenę potencjalnej toksyczności systemowej związanej z ekspozycją oczu.

9. Podejmowane są starania w celu dokładniejszego scharakteryzowania przydatności i ograniczeń badania BCOP w odniesieniu do identyfikowania substancji o słabym działaniu drażniącym i substancji niedrażniących (zob. również pkt 45). Użytkowników zachęca się również do przekazywania próbek lub danych organizacjom walidacyjnym w celu przeprowadzenia formalnej oceny możliwych przyszłych zastosowań metody badania BCOP, w tym do identyfikacji substancji o słabym działaniu drażniącym i substancji niedrażniących.
10. W każdym laboratorium, które zaczyna przeprowadzać to badanie, należy zastosować chemikalia przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 2. Laboratorium może stosować te chemikalia w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania badania metodą BCOP przed przedstawieniem danych z badania BCOP do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

11. Metoda badania BCOP jest modelem organotypycznym, który zapewnia krótkotrwałe zachowanie normalnych funkcji fizjologicznych i biochemicznych rogówki bydłej *in vitro*. Uszkodzenia spowodowane badaną substancją ocenia się w ramach tej metody badania na podstawie ilościowych pomiarów zmian w zmętnieniu i przepuszczalności rogówki przy pomocy odpowiednio miernika zmętnienia oraz spektrofotometru światła widzialnego. Obydwa pomiary stosuje się do obliczenia wskaźnika IVIS, na podstawie którego przypisuje się kategorie klasyfikacji zagrożenia podrażnieniem *in vitro* w celu przewidzenia potencjalnego działania drażniącego dla oczu *in vivo* badanej substancji (zob. kryteria decyzji).
12. W metodzie badania BCOP stosuje się izolowaną rogówkę z oczu bydła pozyskaną bezpośrednio po uboju. Zmętnienie rogówki mierzy się ilościowo jako ilość światła przepuszczanego przez rogówkę. Przepuszczalność mierzy się ilościowo jako ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, jaka przenika przez całą grubość rogówki i jest wykrywana w środku komory tylnej oka. Badane substancje aplikuje się na nabłonek przedni rogówki oraz do komory przedniej pojemnika na rogówkę. Dodatek 3 zawiera opis i rysunek pojemnika na rogówkę stosowanego w metodzie badania BCOP. Pojemniki na rogówkę można nabyć na rynku lub zbudować samodzielnie.

Pochodzenie i wiek oczu bydłych oraz dobór gatunków zwierząt

13. Bydło wysyłane do rzeźni jest zazwyczaj poddawane ubojowi albo dla celów spożycia przez ludzi, albo dla innych celów komercyjnych. Rogówka stosowana w badaniu BCOP pochodzi wyłącznie od zdrowych zwierząt, które uznano za odpowiednie do wprowadzenia do łańcucha żywnościowego człowieka. W związku z tym, że masa bydła jest znacznie zróżnicowana w zależności od rasy, wieku i płci, nie ma zalecanej masy zwierzęcia podczas uboju.
14. Różnice w wymiarach rogówki mogą pojawić się w przypadku, gdy stosuje się oczy pochodzące od zwierząt w różnym wieku. Rogówki o średnicy poziomej $> 30,5$ mm i grubości środkowej części wynoszącej $\geq 1\ 100$ μm uzyskuje się zazwyczaj od bydła w wieku powyżej ośmiu lat, natomiast rogówki o średnicy poziomej $< 28,5$ mm i grubości środkowej części wynoszącej < 900 μm uzyskuje się zazwyczaj od bydła w wieku poniżej pięciu lat (14). W związku z powyższym zazwyczaj nie stosuje się oczu pochodzących od bydła w wieku powyżej 60 miesięcy. Zasadniczo nie stosuje się oczu pochodzących od bydła w wieku poniżej 12 miesięcy, ponieważ są one jeszcze w fazie rozwoju, przez co grubość i średnica rogówki są znacznie mniejsze niż w przypadku oczu dorosłego bydła. Stosowanie rogówek pochodzących od młodych zwierząt (tj. w wieku 6-12 miesięcy) jest jednak dozwolone, ponieważ wiąże się z tym pewne korzyści, na przykład większa dostępność, wąski przedział wiekowy oraz mniejsze zagrożenie związane z potencjalnym narażeniem pracowników na gąbczastą encefalopatię bydła (15). Ze względu na to, że przydatne byłoby przeprowadzenie dalszej oceny wpływu rozmiaru lub grubości rogówki na stopień reakcji na substancje żrące lub drażniące, zachęca się użytkowników do zgłaszania szacowanego wieku lub szacowanej masy zwierząt, od których pobrano rogówki stosowane w badaniu.

Pobieranie oczu i transport do laboratorium

15. Oczy pobierają pracownicy rzeźni. Aby zminimalizować uszkodzenia mechaniczne i inne rodzaje uszkodzeń, enukleację oczu należy przeprowadzać jak najszybciej po śmierci zwierzęcia. Aby zapobiec ekspozycji oczu na potencjalnie drażniące substancje, podczas opłukiwania głowy zwierzęcia pracownicy rzeźni nie powinni używać detergentów.
16. Oczy należy w całości zanurzyć w roztworze HBSS w pojemniku o odpowiednich rozmiarach i przetransportować do laboratorium w taki sposób, żeby zminimalizować możliwość pogorszenia stanu oczu lub skażenia bakteriami. Ponieważ oczy pobiera się w trakcie procesu uboju, mogą one być narażone na kontakt z krwią i innymi substancjami biologicznymi, w tym z bakteriami i innymi mikroorganizmami. Ważne jest zatem, aby zapewnić zminimalizowanie ryzyka skażenia (np. poprzez umieszczenie pojemnika zawierającego oczy w lodzie, poprzez dodanie antybiotyków do roztworu HBSS używanego do przechowywania oczu podczas transportu [np. penicylina o stężeniu 100 j.m./ml i streptomycyna o stężeniu 100 mg/ml]).
17. Należy zminimalizować odstęp czasu między pobraniem oczu a użyciem rogówek w badaniu BCOP (zazwyczaj pobranie i użycie następuje tego samego dnia) oraz wykazać, że nie wpłynie on negatywnie na wyniki badania. Wyniki badania opierają się na kryteriach doboru oczu, jak również na reakcjach w ramach kontroli pozytywnej i negatywnej. Wszystkie oczy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z tej samej grupy oczu pobranych danego dnia.

Kryteria doboru oczu stosowanych w badaniu BCOP

18. Po dostarczeniu do laboratorium oczy są dokładnie badane pod kątem wad, m.in. zwiększonego zmętnienia, zadrapań i neowaskularyzacji. Wyłącznie rogówki pochodzące z oczu niewykazujących takich wad mogą zostać wykorzystane w badaniu.
19. Jakość każdej rogówki jest również oceniana w późniejszych etapach badania. Należy odrzucić te rogówki, których zmętnienie po wstępnym, jednogodzinnym okresie inkubacji przekracza siedem jednostek zmętnienia (UWAGA: miernik zmętnienia należy poddać wzorcowaniu według norm zmętnienia, które stosuje się do ustalania jednostek zmętnienia, zob. dodatek 3).
20. Każda badana grupa (badana substancja, równoczesna kontrola negatywna i pozytywna) składa się z co najmniej trojga oczu. Trzy rogówki należy wykorzystać do kontroli negatywnej w badaniu BCOP. Ponieważ wszystkie rogówki są wycinane z całej gałki ocznej i umieszczane w komorach rogówkowych, istnieje możliwość powstania artefaktów wynikających z obróbki w odniesieniu do wartości zmętnienia i przepuszczalności poszczególnych rogówek (włączając kontrolę negatywną). Ponadto wartości zmętnienia i przepuszczalności uzyskane z rogówek służących do kontroli negatywnej są stosowane w celu skorygowania wartości zmętnienia i przepuszczalności rogówki uzyskanych w wyniku działania badanej substancji i kontroli pozytywnej w obliczeniach wskaźnika IVIS.

PROCEDURA**Przygotowanie oczu**

21. Rogówki niewykazujące nieprawidłowości wycina się wraz z 2-3 mm obwódką twardówki w celu ułatwienia dalszej obróbki. Dokłada się starań, aby uniknąć uszkodzenia nabłonka przedniego i nabłonka tylnego rogówki. Izolowane rogówki umieszcza się w specjalnie zaprojektowanych pojemnikach na rogówkę, składających się z komory przedniej i tylnej, które stykają się odpowiednio z nabłonkiem przednim i nabłonkiem tylnym rogówki. Obydwie komory są maksymalnie wypełniane wcześniej podgrzaną pożywką hodowlaną Eagle'a (EMEM) (najpierw komora tylna) w celu zagwarantowania, że nie utworzą się żadne pęcherzyki powietrza. Następnie urządzenie utrzymuje się w temperaturze $32 \pm 1^\circ\text{C}$ przez co najmniej godzinę w celu zrównoważenia rogówek w pożywce i uzyskania ich normalnej aktywności metabolicznej w zakresie, w jakim jest to możliwe (temperatura na powierzchni rogówki *in vivo* wynosi w przybliżeniu 32°C).
22. Po okresie inkubacji do obydwu komór dodaje się świeżą, wcześniej podgrzaną pożywkę EMEM oraz pobiera się wyjściowe odczyty zmętnienia dla każdej rogówki. Odrzuca się każdą rogówkę, która wykazuje makroskopowe uszkodzenia tkanki (np. zadrapania, przebarwienia, neowaskularyzacja) lub zmętnienie > 7 jednostek zmętnienia. Oblicza się średnie zmętnienie wszystkich inkubowanych rogówek. Co najmniej trzy rogówki o wartościach zmętnienia zbliżonych do średniej wartości dla wszystkich rogówek wybiera się jako rogówki do kontroli negatywnej (kontroli z zastosowaniem rozpuszczalnika). Pozostałe rogówki trafiają następnie do grupy badanej i grupy kontroli pozytywnej.
23. Ze względu na to, że pojemność cieplna wody jest wyższa od pojemności cieplnej powietrza, woda zapewnia stabilniejsze warunki temperatury dla inkubacji. Zaleca się zatem stosowanie kąpeli wodnej w celu utrzymania pojemnika na rogówkę i jego zawartości w temperaturze $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Niemniej można również zastosować inkubatory powietrzne, pod warunkiem że podejmie się środki ostrożności w celu utrzymania stabilnej temperatury (np. poprzez wcześniejsze podgrzewanie pojemników i pożywek).

Podanie substancji badanej

24. Stosuje się dwa różne protokoły zabiegu – jeden dla cieczy i substancji powierzchniowo czynnych (stałych lub ciekłych), zaś drugi dla ciał stałych niebędących substancjami powierzchniowo czynnymi.
25. Ciecze bada się w stanie nierozcieńczonym, natomiast substancje powierzchniowo czynne bada się w stężeniu 10 % w/v w 0,9 % roztworze chlorku sodu, w wodzie destylowanej lub innym rozpuszczalniku, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy. Ciała półstałe, kremy i woski są zazwyczaj badane tak jak ciecze. Zastosowanie innych stężeń należy odpowiednio uzasadnić. Ekspozycja rogówek na działanie cieczy i substancji powierzchniowo czynnych trwa 10 minut. Zastosowanie innego czasu ekspozycji wymaga przedstawienia racjonalnego uzasadnienia naukowego.
26. Ciała stałe niebędące substancjami powierzchniowo czynnymi bada się zazwyczaj tak jak roztwory i zawiesiny w stężeniu 20 % w/v w 0,9 % roztworze chlorku sodu, w wodzie destylowanej lub innym rozpuszczalniku, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy. W niektórych okolicznościach, po przedstawieniu odpowiedniego uzasadnienia naukowego, ciała stałe również można badać w postaci nierozcieńczonej poprzez bezpośrednią aplikację na powierzchnię rogówki z zastosowaniem metody „otwartej komory” (zob. pkt 29). Ekspozycja rogówek na działanie ciał stałych trwa cztery godziny, ale podobnie jak w przypadku cieczy i substancji powierzchniowo czynnych możliwe jest zastosowanie innego czasu ekspozycji, pod warunkiem przedstawienia właściwego uzasadnienia naukowego.
27. W zależności od stanu skupienia i właściwości chemicznych (np. ciała stałe, ciecze, ciecze lepkie oraz ciecze nielepkie) badanej substancji można zastosować różne metody badania. Najważniejsze jest, aby upewnić się, że nabłonek przedni został pokryty badaną substancją w odpowiedni sposób oraz że odpowiednio ją usunięto w trakcie płukania. Metodę „zamkniętej komory” stosuje się zwykle w przypadku cieczy nielepkich i cieczy lekko lepkich, natomiast metodę „otwartej komory” stosuje się zwykle w przypadku cieczy częściowo lepkich i lepkich oraz nierozcieńczonych ciał stałych.

28. W przypadku metody „zamkniętej komory” badaną substancję, w ilości wystarczającej (750 µl) do pokrycia nabłonka przedniego rogówki, wprowadza się do komory przedniej przez otwory do dawkowania znajdujące się w górnej części komory, które następnie w trakcie ekspozycji uszczelnia się specjalnymi zatyczkami. Należy dopilnować, aby czas ekspozycji każdej rogówki na działanie badanej substancji był właściwy.
29. W przypadku metody „otwartej komory” przed rozpoczęciem badania z komory przedniej usuwa się pierścien zabezpieczający okienko i szklane okienko. Substancja kontrolna lub badana (750 µl lub w ilości wystarczającej do całkowitego pokrycia rogówki) jest aplikowana bezpośrednio na nabłonek przedni rogówki za pomocą mikropipety. Jeżeli trudno jest zaaplikować badaną substancję za pomocą pipety, wówczas można taką substancję wprowadzić pod ciśnieniem do pipety tłokowej, aby ułatwić dawkowanie. Końcówkę pipety tłokowej umieszcza się w końcówce dawkującej strzykawki w celu wprowadzenia substancji do końcówki pipety tłokowej pod ciśnieniem. W miarę naciskania tłoka strzykawki, tłok pipety podnosi się. Jeżeli w końcówce pipety pojawią się pęcherzyki powietrza, usuwa się badaną substancję i cały proces jest powtarzany, dopóki końcówka nie zostanie napełniona bez pęcherzyków powietrza. W miarę konieczności można zastosować normalną strzykawkę (bez igły), ponieważ umożliwi ona dokładne zmierzenie ilości badanej substancji oraz ułatwia jej aplikację na nabłonek przedni rogówki. Po podaniu substancji szklane okienko z powrotem umieszcza się w komorze przedniej, aby przywrócić układ zamknięty.

Inkubacja po zakończeniu ekspozycji

30. Po okresie ekspozycji usuwa się badaną substancję, substancję do kontroli negatywnej lub substancję do kontroli pozytywnej z komory przedniej, zaś nabłonek przedni przemywa się co najmniej trzy razy (lub dopóki nie znikną wszystkie widoczne ślady badanej substancji) przy użyciu pożywki EMEM (zawierającej czerwień fenolową). Do splukiwania stosuje się pożywkę zawierającą czerwień fenolową, ponieważ na podstawie zmiany barwy czerwieni fenolowej można określić skuteczności splukiwania substancji kwasowych lub zasadowych. Rogówki przemywa się więcej niż trzy razy, jeżeli czerwień fenolowa ma w dalszym ciągu zmienioną barwę (żółtą lub fioletową) lub jeśli badana substancja jest w dalszym ciągu widoczna. Po oczyszczeniu pożywki z badanej substancji rogówki opłukuje się po raz ostatni pożywką EMEM (bez czerwieni fenolowej). Pożywka EMEM (bez czerwieni fenolowej) jest używana do ostatniego opłukania, aby zapewnić usunięcie czerwieni fenolowej z komory przedniej przed rozpoczęciem pomiaru zmetnienia. Następnie ponownie wypełnia się komorę przednią świeżą pożywką EMEM bez czerwieni fenolowej.
31. W przypadku cieczy lub substancji powierzchniowo czynnych rogówki są inkubowane przez kolejne dwie godziny w temperaturze 32 ± 1 °C. W niektórych sytuacjach potrzebny może być dłuższy czas dodatkowej ekspozycji; jego wprowadzenie należy rozważyć indywidualnie dla każdego przypadku. Rogówki wystawione na działanie ciał stałych poddaje się dokładnemu płukaniu po zakończeniu czterogodzinnej ekspozycji, ale nie wymagają one dodatkowej inkubacji.
32. Pod koniec okresu dodatkowej inkubacji w przypadku cieczy i substancji powierzchniowo czynnych oraz pod koniec czterogodzinnej ekspozycji w przypadku ciał stałych niebędących substancjami powierzchniowo czynnymi dokonuje się pomiaru zmetnienia i przepuszczalności każdej rogówki. Każdą rogówkę obserwuje się również wzrokowo i zapisuje się istotne obserwacje (np. łuszczenie się tkanki, pozostałości badanej substancji, niejednolite zmetnienie). Powyższe obserwacje mogą mieć istotne znaczenie, ponieważ mogą znaleźć odzwierciedlenie w zmienności odczytów miernika zmetnienia.

Substancje kontrolne

33. Każde doświadczenie obejmuje równoczesną kontrolę negatywną lub kontrolę z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika i kontrolę pozytywną.
34. W przypadku badania cieczy o stężeniu 100 % w metodzie badania BCOP uwzględnia się równoczesną kontrolę negatywną (np. 0,9 % roztwór chlorku sodu lub woda destylowana) w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia punktu odniesienia dla punktów końcowych badania. Kontrola negatywna gwarantuje również, że warunki badania nie wywołują niepożądanego reakcji w postaci podrażnienia.
35. W przypadku badania cieczy rozcieńczonej, substancji powierzchniowo czynnej lub ciała stałego w metodzie badania BCOP uwzględnia się równoczesną grupę kontroli z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zapewnienia punktu odniesienia dla punktów końcowych badania. Stosować można jedynie rozpuszczalnik/nośnik, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy.
36. W każdym doświadczeniu uwzględnia się substancję o znanym działaniu drażniącym dla oczu, służącą do przeprowadzenia równoczesnej kontroli pozytywnej w celu zweryfikowania, czy wywołana została właściwa reakcja. Ponieważ w niniejszej metodzie badania stosuje się badanie BCOP w celu zidentyfikowania substancji żrących i silnie drażniących, w idealnej sytuacji do kontroli pozytywnej powinna zostać użyta substancja referencyjna, która wywołuje silną reakcję w takiej metodzie badania. Aby jednak zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli pozytywnej w czasie, podrażnienie nie powinno być nadmierne.
37. Do celów kontroli pozytywnej w przypadku badanych cieczy można zastosować na przykład dimetyloformamid lub 1 % roztwór wodorotlenku sodu. Do celów kontroli pozytywnej w przypadku badanych ciał stałych można zastosować na przykład 20 % (waga w stosunku do objętości) imidazol w 0,9 % roztworze chlorku sodu.

38. Substancje wzorcowe są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego dla oczu nieznanymi chemikaliami z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci podrażnienia.

Pomiar punktów końcowych

39. Zmętnienie określa się na podstawie ilości światła przepuszczanego przez rogówkę. Zmętnienie rogówki mierzy się ilościowo przy pomocy miernika zmętnienia, w wyniku czego otrzymuje się wartości zmętnienia mierzone na skali ciągłej.
40. Przepuszczalność określa się na podstawie ilości barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny, jaka przenika przez wszystkie warstwy rogówki (tj. przez nabłonek przedni na zewnętrznej powierzchni rogówki po nabłonek tylny na wewnętrznej powierzchni rogówki). Do komory przedniej pojemnika na rogówkę, która styka się z nabłonkiem przednim rogówki, dodaje się roztwór 1 ml soli sodowej fluoresceiny (odpowiednio 4 lub 5 mg/ml w przypadku badania cieczy i substancji powierzchniowo czynnych lub ciał stałych niebędących substancjami powierzchniowo czynnymi), natomiast komorę tylną, która styka się z nabłonkiem tylnym rogówki, wypełnia się świeżą pożywką EMEM. Następnie pojemnik inkubuje się w pozycji poziomej przez 90 ± 5 min w temperaturze 32 ± 1 °C. Ilość soli sodowej fluoresceiny, jaka przedostaje się do komory tylnej, jest mierzona ilościowo przy pomocy spektrofotometrii UV/VIS. Pomiary spektrofotometryczne przy długości fali 490 nm rejestruje się jako wartości gęstości optycznej (OD_{490}) lub absorbancji mierzone na skali ciągłej. Wartości przepuszczalności fluoresceiny określa się przy użyciu wartości OD_{490} otrzymanych w wyniku zastosowania spektrofotometru światła widzialnego, w którym stosuje się standardową 1 cm drogę optyczną.
41. Można ewentualnie zastosować czytnik płytek 96-dołkowych, pod warunkiem że: (i) można ustalić zakres liniowy czytnika płytek w celu określenia wartości OD_{490} fluoresceiny oraz (ii) odpowiednia liczba próbek fluoresceiny zostanie użyta w płytce 96-dołkowej, aby otrzymać wartości OD_{490} równoważne standardowej 1 cm drodze optycznej (konieczne może być całkowite wypełnienie dołków [zwykle 360 ml]).

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Ocena danych

42. Po skorygowaniu wartości zmętnienia i średniej przepuszczalności (OD_{490}) względem wartości zmętnienia i negatywnej kontroli przepuszczalności OD_{490} tła, średnie wartości zmętnienia i przepuszczalności OD_{490} dla każdej badanej grupy należy połączyć w opracowany empirycznie wzór w celu obliczenia wskaźnika podrażnienia *in vitro* (IVIS) w odniesieniu do każdej badanej grupy w następujący sposób:

$$IVIS = \text{średnia wartość zmętnienia} + (15 \times \text{średnia wartość przepuszczalności } OD_{490})$$

Sina i in. (16) podaje, że powyższy wzór opracowano w trakcie badań wewnętrznych i międzylaboratoryjnych. Dane otrzymane dla serii 36 związków w badaniu międzylaboratoryjnym poddano analizie wielowymiarowej w celu wyznaczenia równania, które najlepiej opisuje zależność między danymi *in vivo* a danymi *in vitro*. Analizę przeprowadzili naukowcy w dwóch odrębnych przedsiębiorstwach, którzy otrzymali niemalże identyczne wzory.

43. Wartości zmętnienia i przepuszczalności również należy oceniać niezależnie, aby stwierdzić, czy badana substancja wywoływała działanie żrące lub silnie drażniące wyłącznie w jednym z dwóch punktów końcowych (zob. kryteria decyzji).

Kryteria decyzji

44. Substancję, w przypadku której wskaźnik IVIS wynosi $\geq 55,1$, określa się jako żrącą lub silnie drażniącą. Zgodnie z pkt 1 jeżeli badana substancja nie została zidentyfikowana jako żrąca lub silnie drażniąca dla oczu, należy przeprowadzić dodatkowe badanie do celów klasyfikacji i oznakowania. Metoda badania BCOP wykazuje ogólną dokładność od 79 % (113/143) do 81 % (119/147), odsetek wyników fałszywie dodatnich od 19 % (20/103) do 21 % (22/103), odsetek wyników fałszywie ujemnych od 16 % (7/43) do 25 % (10/40) w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badania *in vivo* na oku królika, sklasyfikowanych zgodnie z systemami klasyfikacji EPA (1), UE (2) lub GHS (3). Jeżeli substancje należące do określonych klas chemicznych (tj. alkohole, ketony) lub fizycznych (tj. ciała stałe) są wyłączone z bazy danych, dokładność badania BCOP wg systemów klasyfikacji UE, EPA i GHS wynosi od 87 % (72/83) do 92 % (78/85), odsetek wyników fałszywie dodatnich – od 12 % (7/58) do 16 % (9/56), a odsetek wyników fałszywie ujemnych – od 0 % (0/27) do 12 % (3/26).
45. Nawet jeżeli badana substancja nie zostanie zaklasyfikowana jako żrąca lub silnie drażniąca dla oczu, dane z badania BCOP mogą być przydatne, w połączeniu z danymi z badania *in vivo* na oku królika lub z innego odpowiednio zwalidowanego badania *in vitro*, w celu dalszej oceny przydatności i ograniczeń metody badania BCOP w odniesieniu do identyfikacji substancji o słabym działaniu drażniącym i substancji niedrażniących (trwają prace nad dokumentem zawierającym wytyczne dotyczące stosowania metod badania toksyczności dla oczu *in vitro*).

Kryteria dopuszczalności badania

46. Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli kontrola pozytywna daje wskaźnik IVIS, który mieści się w ramach dwóch standardowych odchyień od obecnej historycznej średniej, którą należy aktualizować co najmniej co trzy miesiące lub za każdym razem, gdy dopuszczalne badanie jest przeprowadzane w laboratoriach, w których rzadko przeprowadza się badania (tj. rzadziej niż raz na miesiąc). Wartości zmętnienia i przepuszczalności otrzymane w wyniku reakcji kontroli negatywnej lub kontroli z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika powinny być niższe od ustalonych górnych limitów wartości zmętnienia i przepuszczalności tła dla rogówek bydłych poddanych odpowiedniej kontroli negatywnej lub kontroli z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika.

Sprawozdanie z badania

47. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Substancje badane i kontrolne

Nazwa chemiczna (nazwy chemiczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane;

Numer CAS, jeżeli jest znany;

Czystość i skład substancji lub mieszaniny (w procentach masy), w miarę dostępności tych informacji;

Właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, klasa chemiczna, rozpuszczalność w wodzie;

W stosownych przypadkach obróbka substancji badanych/kontrolnych przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);

Stabilność, jeżeli jest znana.

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

Nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

Identyfikacja źródła oczu (tj. zakład, w którym je pobrano);

Warunki przechowywania i transportu oczu (np. data i czas pobrania oczu, odstęp czasu między pobraniem oczu a rozpoczęciem badania, środek transportu i temperatura, wszelkie podane antybiotyki);

W miarę dostępności szczegółowe dane na temat zwierząt, od których pobrano oczy (np. wiek, płeć, masa zwierzęcia dawcy).

*Uzasadnienie zastosowanej metody badania i protokołu**Integralność metody badania*

Procedura zastosowana w celu zapewnienia integralności (tj. dokładności i wiarygodności) metody badania w czasie (np. okresowe badanie substancji do oceny biegłości, wykorzystanie historycznych danych z kontroli negatywnej i pozytywnej).

Kryteria dotyczące badania dopuszczalnego

Dopuszczalny zakres równoczesnej kontroli pozytywnej i negatywnej na podstawie danych historycznych;

W stosownych przypadkach dopuszczalny zakres równoczesnej kontroli odniesienia na podstawie danych historycznych.

Warunki badania

Opis zastosowanego układu badawczego;

Rodzaj zastosowanego pojemnika na rogówkę;

Informacje na temat wzorcowania urządzeń zastosowanych do pomiaru zmętnienia i przepuszczalności (np. miernik zmętnienia i spektrofotometr);

Informacje na temat zastosowanych rogowek bydłych, w tym oświadczenia dotyczące ich jakości;

Szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badania;

Zastosowane stężenie badanej substancji;

Opis wszelkich modyfikacji procedury badania;

Odniesienie do danych historycznych dotyczących modelu (np. kontrole pozytywne i negatywne, substancje do oceny biegłości, substancje wzorcowe);

Opis stosowanych kryteriów oceny.

Wyniki

Tabelaryczne zestawienie danych dotyczących pojedynczych badanych próbek (np. wartości zmętnienia i OD₄₉₀ oraz obliczony wskaźnik IVIS dla badanej substancji i kontroli pozytywnej, negatywnej i odniesienia [jeżeli została uwzględniona], przedstawione w tabelarycznej formie, w stosownych przypadkach z uwzględnieniem danych z powtórzeń doświadczenia z replikatem oraz średnich \pm odchylenie standardowe dla każdego doświadczenia);

Opis innych zaobserwowanych skutków.

Omówienie wyników

Wnioski

LITERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.
- (3) ONZ (2007). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, publikacje ONZ, Nowy Jork i Genewa 2007. Dostępny na stronie internetowej:

[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. Dostępne na stronie internetowej:

[<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). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- (6) Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Dostępne na stronie internetowej:

[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). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej:
- [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. Publikacja NIH nr: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostępne na stronie internetowej:
- [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, Włochy: Europejskie Centrum Uznawania Metod Alternatywnych (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. Dostępne na stronie internetowej:
- [<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. Dostępne na stronie internetowej:
- [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. Dostępne na stronie internetowej:
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej „istotności”. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania.

Substancja wzorcowa: substancja używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizyczne/chemiczne; (iv) dane potwierdzające występowanie znanych skutków oraz (v) znany potencjał w zakresie pożądaných reakcji.

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

Zmętnienie rogówki: pomiar stopnia zmętnienia rogówki wskutek ekspozycji na badaną substancję. Zwiększone zmętnienie rogówki wskazuje na jej uszkodzenie. Zmętnienie można ocenić subiektywnie, jak w przypadku testu Draize'a wykonywanego na oku królika, lub obiektywnie przy użyciu odpowiedniego narzędzia, np. „miernika zmętnienia”.

Przepuszczalność rogówki: ilościowy pomiar szkody wyrządzonej w nabłonku przednim rogówki poprzez określenie, jaka ilość barwnika na bazie soli sodowej fluoresceiny przenika przez wszystkie warstwy rogówki.

Kategoria I EPA: działanie żrące (nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka) lub zmiany rogówkowe lub podrażnienie rogówki utrzymujące się dłużej niż 21 dni (1).

Kategoria R41 UE: spowodowanie uszkodzenia tkanki w oku lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia w następstwie nałożenia badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które nie jest całkowicie odwracalne w ciągu 21 dni od nałożenia (2).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich obecnych substancji fałszywie zidentyfikowanych w wyniku zastosowania metody badawczej jako nieobecne. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badania.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich nieobecnych substancji fałszywie zidentyfikowanych w wyniku zastosowania metody badawczej jako obecne. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badania.

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów): system proponujący klasyfikację chemikaliów (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawiający odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich działań niepożądanych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (3).

Kategoria 1 GHS: spowodowanie uszkodzenia tkanki w oku lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia w następstwie nałożenia badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które nie jest całkowicie odwracalne w ciągu 21 dni od nałożenia (3).

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do negatywnych skutków w przypadku ekspozycji organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

Wskaźnik podrażnienia *in vitro* (IVIS): opracowany empirycznie wzór stosowany w badaniu zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła (BCOP), zgodnie z którym średnie wartości zmętnienia i przepuszczalności dla każdej badanej grupy są łączone w jeden wskaźnik *in vitro* dla każdej badanej grupy. IVIS = średnia wartość zmętnienia + (15 x średnia wartość przepuszczalności).

Kontrola negatywna: replikat niepoddany działaniu badanej substancji, zawierający wszystkie składniki układu badawczego. Próbką ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Niedrażniące: substancje, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii I, II lub III EPA, kategorii R41 lub R36 UE lub kategorii 1, 2A lub 2B GHS jako drażniące dla oczu.

Żrące dla oczu: a) substancja, która powoduje nieodwracalne uszkodzenie tkanki w oku; b) substancje, które zaklasyfikowano do kategorii 1 GHS, kategorii I EPA lub kategorii R41 UE jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Drażniące dla oczu: a) substancja, która powoduje odwracalną zmianę w oku w następstwie jej nałożenia na przednią powierzchnię oka; b) substancje, które zaklasyfikowano do kategorii II lub III EPA, kategorii R36 UE lub kategorii 2A lub 2B GHS jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Silnie drażniące dla oczu: a) substancja, która powoduje zmianę w oku w następstwie jej zaaplikowania na przednią powierzchnię oka, która nie ustępuje w ciągu 21 dni od nałożenia lub powoduje poważne fizyczne pogorszenie widzenia; b) substancje, które zaklasyfikowano do kategorii I GHS, kategorii I EPA lub kategorii R41 UE jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Miernik zmętnienia: narzędzie stosowane do pomiaru stopnia „zmętnienia rogówki” poprzez ilościową ocenę przepuszczalności światła przez rogówkę. Typowe urządzenie posiada dwie komory, z których każda ma własne źródło światła i fotokomórkę. W jednej z komór znajduje się badana rogówka, natomiast druga jest używana do wzorcowania i zerowania urządzenia. Światło z lampy halogenowej jest kierowane na fotokomórkę przez komorę kontrolną (pustą komorę bez okien i płynu), a następnie porównywane ze światłem kierowanym na fotokomórkę przez komorę doświadczalną, w której znajduje się komora zawierająca rogówkę. Porównuje się różnicę w przepuszczalności światła między fotokomórkami, a wartość liczbową zmętnienia przedstawiana jest na wyświetlaczu cyfrowym.

Kontrola pozytywna: replikat zawierający wszystkie składniki układu badawczego, który został poddany działaniu substancji, o której wiadomo, że wywoła reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli pozytywnej w czasie, podrażnienie nie powinno być nadmierne.

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w czasie, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej oraz powtarzalności wewnątrzlaboratoryjnej.

Kontrola z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. Jeżeli równocześnie przeprowadza się kontrolę negatywną, próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Badanie wielopoziomowe: stopniowa strategia badawcza, zgodnie z którą wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji są analizowane na każdym etapie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego etapu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji potencjał wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są potrzebne. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji potencjału wywołania podrażnienia, przeprowadza się procedurę stopniowych badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, aż będzie możliwe dokonanie jednoznacznej klasyfikacji.

Zwalidowana metoda badania: metoda badania, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zwalidowana metoda badania może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia istotności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych elementów informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję oraz w celu potwierdzenia takiego wniosku.

Dodatek 2

Substancje do oceny biegłości w odniesieniu do metody badania BCOP

Przed rozpoczęciem rutynowego stosowania metody badania zgodnej z niniejszą metodą badania laboratoria mogą podjąć się wykazania swojej biegłości technicznej prawidłowo identyfikując klasyfikację stopnia działania żrącego 10 substancji wskazanych w tabeli 1. Substancje te zostały wybrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na miejscowe działanie drażniące/żrące dla oczu oparty na wynikach badania *in vivo* na oku królika (TG 405) (np. kategorie 1, 2A, 2B lub nieklasyfikowane ani nieoznakowane zgodnie z GHS ONZ) (3)(7). Biorąc pod uwagę zwalidowaną użyteczność tych badań (tj. wyłącznie do identyfikowania substancji żrących/silnie drażniących dla oczu), istnieją jednak tylko dwa wykazujące efektywność wyniki badań dla potrzeb klasyfikacji (substancja żrąca/drażniąca lub substancja nieżrąca/niedrażniąca). Innymi kryteriami doboru były: dostępność handlowa substancji, wysoka jakość dostępnych danych odniesienia z badań *in vivo* oraz istnienie wysokiej jakości danych dotyczących dwóch metod *in vitro*, w odniesieniu do których przygotowuje się wytyczne dotyczące badań. Z tego powodu substancje drażniące wybrano z zalecanego przez Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) wykazu 122 substancji odniesienia do walidacji metod badań *in vitro* toksyczności dla oczu (zob. dodatek H: Zalecane substancje odniesienia ICCVAM) (5). Dane referencyjne znaleźć można w dokumentach przeglądowych ICCVAM dla metody badania BCOP oraz badania na izolowanym oku kurzym (ICE) (17)(18).

Tabela 1

Zalecane substancje do oceny biegłości technicznej w odniesieniu do badania BCOP

Substancja	Nr CAS	Klasa chemiczna ⁽¹⁾	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasyfikacja <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Chlorek benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Związek onioowy	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Chloroheksydyna	55-56-1	Amina, amidyna	Ciało stałe	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Kwas dibenzoilo-1-winowy	2743-38-6	Kwas karboksylowy, ester	Ciało stałe	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Imidazol	288-32-4	Związek heterocykliczny	Ciało stałe	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Kwas trichlorooctowy (30 %)	76-03-9	Kwas karboksylowy	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Chlorek 2,6-dichlorobenzoilu	4659-45-4	Halogenek acylu	Ciecz	Kategoria 2A	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
2-etylo-acetylooctan metylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2B	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Ciało stałe	Kategoria 2A	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Ciecz	Nieoznakowana	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
n-heksan	110-54-3	Węglowodór (acykliczny)	Ciecz	Nieoznakowana	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym

Skróty: Nr CAS = numer w Chemical Abstracts Service

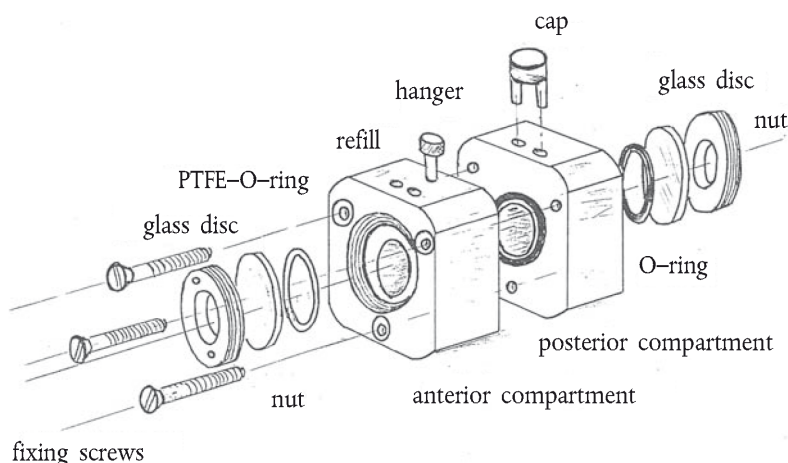
⁽¹⁾ Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji z zastosowaniem standardowego schematu klasyfikacji w oparciu o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH) opracowany przez National Library of Medicine (Krajową Bibliotekę Medyczną) (dostępny pod adresem <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ W oparciu o wyniki badania *in vivo* na oku królika (OECD TG 405) i z zastosowaniem GHS ONZ (3)(7).⁽³⁾ W oparciu o wyniki badań BCOP i ICE.

Dodatek 3

POJEMNIK NA ROGÓWKĘ W BADANIU BCOP

- Pojemniki na rogówkę stosowane w badaniu BCOP wykonane są z materiału obojętnego (np. polipropylenu). Pojemnik składa się z dwóch połówek (komory przedniej i tylnej) i ma dwie podobne do siebie komory wewnętrzne w kształcie cylindrycznym. Każda komora mieści 5 ml cieczy i kończy się szklanym okienkiem, poprzez które można dokonać pomiaru zmętnienia. Każda z komór wewnętrznych ma 1,7 cm średnicy i 2,2 cm głębokości ⁽¹⁾. Pierścień uszczelniający typu „O” umieszczony na komorze tylnej ma zapobiegać wyciekom. Rogówki umieszcza się stroną z nabłonkiem tylnym do dołu na pierścieniu tylnej komory, zaś komorę przednią umieszcza się na stronie z nabłonkiem przednim. Komory utrzymywane są w miejscu przez trzy śruby ze stali nierdzewnej umieszczone na zewnętrznych krawędziach komór. Na końcu każdej komory znajduje się szklane okienko, które można zdemontować w celu uzyskania łatwego dostępu do rogówki. Pomiędzy szklanym okienkiem a komorą umieszczony jest również pierścień uszczelniający typu „O” zapobiegający wyciekom. Dwa otwory na szczycie każdej komory umożliwiają wprowadzanie i usuwanie podłoża i badanych związków. Otwory te są zamknięte gumowymi korkami w czasie badania i w okresie inkubacji.

⁽¹⁾ Podane wymiary oparte są na wymiarach pojemników na rogówkę stosowanych w przypadku krów w wieku od 12 do 60 miesięcy. W przypadku zwierząt w wieku 6–12 miesięcy pojemnik powinien być tak zaprojektowany, aby komora miała pojemność 4 ml, zaś każda z komór wewnętrznych miała średnicę 1,5 cm oraz głębokość 2,2 cm. W przypadku projektowania nowego pojemnika na rogówkę należy pamiętać, że stosunek wielkości eksponowanej powierzchni rogówki do pojemności komory powinien być taki sam jak w tradycyjnym pojemniku. Konieczne jest zapewnienie prawidłowego określenia wartości przepuszczalności na potrzeby obliczenia IVIS przez zastosowanie proponowanego wzoru.



Glosariusz:

Glass disc: Krążek szklany

PTFE-O-ring: Pierścień uszczelniający typu „O” z politetrafluoroetylenu

Refill: Zasobnik

Hanger: Wieszak

Cap: Nakładka

Nut: Nakrętka

O-ring: Pierścień uszczelniający typu „O”

Posterior compartment: Komora tylna

Anterior compartment: Komora przednia

Fixing screws: Śruby podtrzymujące

MIERNIK ZMĘTNIENIA

2. Miernik zmętnienia jest to urządzenie służące do pomiaru przepuszczalności światła. Światło z lampy halogenowej jest kierowane na fotokomórkę przez komorę kontrolną (pustą komorę bez okien i płynu), a następnie porównywane ze światłem kierowanym na fotokomórkę przez komorę doświadczalną, w której znajduje się komora zawierająca rogowkę. Porównuje się różnicę w przepuszczalności światła między fotokomórkami, a wartość liczbową zmętnienia przedstawiana jest na wyświetlaczu cyfrowym. Ustala się jednostki zmętnienia.
3. Miernik zmętnienia powinien dawać liniową odpowiedź złożoną z pojedynczych odczytów zmętnienia obejmujących punkty odcięcia stosowane w różnych klasyfikacjach opisanych w modelu predykcyjnym (tj. do punktu odcięcia wskazującego na działanie żrące/silnie drażniące). W celu zapewnienia dokładnych liniowych odczytów do 75-80 jednostek zmętnienia konieczne jest przeprowadzenia wzorcowania miernika przy użyciu kilku kalibratorów. Kalibratory (nieprzezroczyste arkusze poliestru) umieszczane są w komorze kalibracyjnej (komorze na rogowkę przeznaczony do umieszczenia kalibratorów) i odczytywane na mierniku zmętnienia. Komora wzorcująca jest przeznaczona do umieszczenia kalibratorów w przybliżeniu w takiej samej odległości od źródła światła i fotokomórki, w jakiej zlokalizowane będą rogowki podczas pomiaru zmętnienia. Miernik zmętnienia wzorcuje się najpierw na 0 jednostek zmętnienia przy użyciu komory wzorcującej bez kalibratora. Następnie w komorze wzorcującej umieszcza się pojedynczo różne kalibratory i dokonuje pomiaru zmętnienia. Kalibratory 1, 2 i 3 powinny dawać odczyty zmętnienia równe ich ustalonym wartościom odpowiednio 75, 150 i 225 jednostek zmętnienia, $\pm 5\%$.

B. 48 METODA BADANIA NA IZOLOWANYM OKU KURZYM DO CELÓW IDENTYFIKACJI SUBSTANCJI ŻRĄCYCH I SILNIE DRAŻNIĄCYCH DLA OCZU

WPROWADZENIE

1. Metoda badania na izolowanym oku kurzym (ICE) jest metodą badania *in vitro*, którą można stosować w niektórych okolicznościach i przy określonych ograniczeniach w celu zaklasyfikowania substancji i mieszanin jako »żrące i silnie drażniące dla oczu« (1)(2)(3). Dla celów niniejszej metody badania substancje silnie drażniące oznaczają substancje, które wywołują zmiany utrzymujące się u królika przez co najmniej 21 dni od podania tych substancji. Chociaż uważa się, że badanie ICE nie może całkowicie zastąpić badania *in vivo* na oku królika, zaleca się jego stosowanie w ramach strategii badań wielopoziomowych do celów klasyfikacji regulacyjnej i oznakowania w ramach określonej dziedziny zastosowania (4)(5). Badane substancje i mieszaniny (6), które w tym badaniu dają wyniki dodatnie, można zaklasyfikować jako żrące lub silnie drażniące dla oczu bez przeprowadzania dodatkowych badań na królikach. Substancję, która daje ujemny wynik w badaniu, należy zbadać na królikach za pomocą strategii badań sekwencyjnych, zgodnie z wytycznymi OECD dotyczącymi badań 405 (7) (rozdział B. 5 niniejszego załącznika).
2. Niniejsza metoda badania ma na celu opisanie procedur stosowanych do oceny potencjalnego działania żrącego lub silnie drażniącego dla oczu badanej substancji, określanego na podstawie jej potencjału oddziaływania toksycznego na enukleowane oko kurze. Toksyczne oddziaływanie na rogówkę mierzy się przy zastosowaniu (i) jakościowej oceny zmętnienia, (ii) jakościowej oceny uszkodzenia nabłonka przedniego poprzez zaaplikowanie fluoresceiny na oko (zatrzymanie fluoresceiny), (iii) ilościowego pomiaru zwiększonej grubości (obrzęku) oraz (iv) jakościowej oceny makroskopowych uszkodzeń morfologicznych powierzchni. Oceny zmętnienia rogówki, obrzęku i uszkodzeń po ekspozycji na badaną substancję dokonuje się indywidualnie, a następnie łączy się je w celu otrzymania Klasyfikacji Działania Drażniącego dla Oczu.
3. Metodę badania ICE stosuje się również do badania substancji drażniących dla oczu wywołujących zmiany, które ustępują w ciągu 21 dni, oraz substancji niedrażniących. Dokładność i wiarygodność metody badania ICE w odniesieniu do substancji w tych kategoriach nie została jednak formalnie oceniona.
4. Definicje podano w dodatku 1.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

5. Niniejsza metoda badania opiera się na protokole metody badania ICE Międzyagencyjnego Komitetu Koordynacyjnego ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) (8), który opracowano na podstawie międzynarodowego badania walidacyjnego (4)(5)(9), przy udziale Europejskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych, Japońskiego Centrum Uznawania Metod Alternatywnych oraz Departamentu Jakości Życia Działu Toksykologii i Farmakologii Stosowanej TNO (Niderlandy). Protokół opiera się na informacjach uzyskanych z opublikowanych protokołów oraz bieżących protokołów stosowanych przez TNO (10)(11)(12)(13)(14).
6. Zidentyfikowane ograniczenia niniejszej metody badania opierają się na odsetku wyników fałszywie dodatnich w przypadku alkoholi oraz odsetku wyników fałszywie ujemnych w przypadku ciał stałych i substancji powierzchniowo czynnych (zob. pkt 47) (4). Jeżeli z bazy danych wyłączone zostaną powyższe klasy chemiczne i fizyczne, dokładność badania ICE w systemach klasyfikacji UE, EPA i GHS znacznie się poprawia (4). Ze względu na cel niniejszego badania (tj. zidentyfikowanie wyłącznie substancji żrących/silnie drażniących dla oczu) odsetek wyników fałszywie ujemnych nie ma decydującego znaczenia, ponieważ substancje takie zostaną następnie zbadane na królikach lub za pomocą innych odpowiednio zwalidowanych badań *in vitro*, w zależności od wymogów określonych w przepisach, przy zastosowaniu strategii badań sekwencyjnych zgodnie z podejściem opartym na analizie wagi dowodów. Ponadto obecna baza danych walidacyjnych nie pozwala na odpowiednią ocenę niektórych klas chemicznych lub produktowych (np. mieszanin). Osoby przeprowadzające badanie mogą jednak rozważyć zastosowanie niniejszej metody badania w odniesieniu do wszystkich rodzajów materiału (w tym mieszanin), w przypadku którego wynik dodatni można zaakceptować jako wskazujący na działanie żrące lub silnie drażniące dla oczu. Dodatkowo wyniki uzyskane w przypadku alkoholi należy jednak interpretować z ostrożnością ze względu na ryzyko ich zawyżenia.
7. Wszystkie procedury przeprowadzane z wykorzystaniem oczu kurzych powinny przebiegać zgodnie z regulaminami i procedurami postępowania z materiałem pozyskanym od ludzi lub zwierząt, który obejmuje m.in. tkanki i płyny tkankowe, obowiązującymi w placówce przeprowadzającej badanie. Zaleca się przestrzeganie ogólnych środków ostrożności dla laboratoriów (15).
8. Ograniczeniem niniejszej metody badania jest fakt, że chociaż uwzględnia się w niej niektóre skutki dla oczu oceniane przy zastosowaniu metody badania podrażnienia oczu królika i w pewnym zakresie stopień tych podrażnień, nie bierze się w niej pod uwagę uszkodzeń spojówki i tęczówki. Ponadto, chociaż w badaniu ICE nie można ocenić odwracalności zmian w rogówce samych w sobie, zaproponowano, na podstawie badań oczu królika, możliwość zastosowania oceny początkowego stadium uszkodzenia rogówki w celu rozróżnienia między skutkami nieodwracalnymi i odwracalnymi (16). Badanie ICE nie pozwala też na ocenę potencjalnej toksyczności systemowej związanej z ekspozycją oczu.
9. Podejmowane są starania w celu dokładniejszego scharakteryzowania przydatności i ograniczeń badania ICE w odniesieniu do identyfikowania substancji, które nie są silnie drażniące, i substancji niedrażniących (zob. również pkt 48). Użytkowników zachęca się również do przekazywania próbek lub danych organizacjom walidacyjnym w celu przeprowadzenia formalnej oceny możliwych przyszłych zastosowań metody badania ICE, w tym do identyfikacji substancji o słabym działaniu drażniącym i substancji niedrażniących.

10. W każdym laboratorium zaczynającym przeprowadzanie tego badania należy zastosować chemikalia przeznaczone do oceny biegłości wymienione w dodatku 2. Laboratorium może stosować te chemikalia w celu wykazania swojej biegłości technicznej w zakresie przeprowadzania badania metodą ICE przed przedstawieniem danych z badania ICE do celów regulacyjnej klasyfikacji zagrożeń.

ZASADA BADANIA

11. Metoda badania ICE jest modelem organotypycznym, który zapewnia krótkotrwałe zachowanie oka kurzego *in vitro*. Uszkodzenia spowodowane badaną substancją ocenia się w ramach tej metody badania na podstawie obrzęku i zmętnienia rogówki oraz zatrzymania fluoresceiny. Podczas gdy dwa ostatnie parametry wymagają oceny jakościowej, analiza obrzęku rogówki stanowi ocenę ilościową. Każdy pomiar przelicza się na wynik ilościowy stosowany do obliczania ogólnego wskaźnika podrażnienia lub też przypisuje się mu kategorię jakościową stosowaną do przypisania kategorii w klasyfikacji *in vitro* działania żrącego i drażniącego dla oczu. Każdy z tych wyników można następnie zastosować do przewidzenia potencjalnego działania żrącego lub drażniącego dla oczu *in vivo* (zob. kryteria decyzji).

Pochodzenie i wiek oczu kurzych

12. Oczy do niniejszego badania pobiera się tradycyjnie od kurcząt uzyskiwanych z rzeźni, w której są one poddawane ubojowi na potrzeby spożycia przez ludzi, co eliminuje konieczność wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych. Stosuje się wyłącznie oczy zwierząt zdrowych, które uznano za odpowiednie do wprowadzenia do łańcucha żywnościowego człowieka.
13. Chociaż nie przeprowadzono badania z grupą kontrolną w celu oceny optymalnego wieku kurcząt, wiek i masa kurcząt wykorzystywanych dotychczas do niniejszego badania odpowiadają młodym kurczętom tradycyjnie przetwarzanym przez rzeźnię drobiu (tzn. ok. 7 tygodni, 1,5-2,5 kg).

Pobieranie oczu i transport do laboratorium

14. Głowy należy usunąć natychmiast po uśmierceniu kurcząt (najczęściej przy użyciu wstrząsu elektrycznego) i nacięciu szyi w celu wywołania krwawienia. Należy zapewnić lokalne źródło kurcząt, zlokalizowane blisko laboratorium, tak by głowy zwierząt mogły zostać przetransportowane z rzeźni do laboratorium na tyle szybko, żeby zminimalizować możliwość pogorszenia stanu oczu lub skażenia bakteriami. Należy zminimalizować odstęp czasu między pobraniem głów kurcząt i użyciem oczu w badaniu ICE (zwykle do dwóch godzin) oraz wykazać, że nie wpłynie on negatywnie na wyniki badania. Wyniki badania opierają się na kryteriach doboru oczu, jak również na reakcjach w ramach kontroli pozytywnej i negatywnej. Wszystkie oczy wykorzystane w badaniu powinny pochodzić z tej samej grupy oczu pobranych danego dnia.
15. Ponieważ oczy wycina się w laboratorium, głowy w stanie nienaruszonym są transportowane z rzeźni w temperaturze otoczenia, w plastikowych pojemnikach nawilżanych ręcznikami zmoczonymi w izotonicznym roztworze soli.

Kryteria doboru oczu zastosowane w badaniu ICE

16. Odrzuca się oczy wykazujące po enukleacji wysoki poziom wybarwienia fluoresceiną (tzn. $> 0,5$) lub zmętnienia rogówki (tzn. $> 0,5$).
17. Każda badana grupa oraz grupa równoczesnej kontroli pozytywnej składa się z co najmniej trojga oczu. Grupa kontroli negatywnej lub kontroli z zastosowaniem rozpuszczalnika (w przypadku stosowania rozpuszczalnika innego niż roztwór soli) składa się z co najmniej jednego oka.

PROCEDURA

Przygotowanie oczu

18. Powieki wycina się ostrożnie, tak aby nie uszkodzić rogówki. Szybkiej oceny, czy rogówka jest nienaruszona, dokonuje się poprzez wkroplenie 2 % (w/v) soli sodowej fluoresceiny na powierzchnię rogówki na kilka sekund, a następnie przemycie rogówki izotonicznym roztworem soli. Oczy poddane działaniu fluoresceiny bada się następnie przy użyciu mikroskopu z lampą szczelinową w celu zagwarantowania, że rogówka nie jest uszkodzona (tzn. że wyniki zatrzymania fluoresceiny oraz zmętnienia $\leq 0,5$).
19. Jeżeli oko nie jest uszkodzone, wycina się je całkowicie z czaszki, starając się nie uszkodzić rogówki. Gałkę oczną wyciąga się z oczodołu przytrzymując mocno migotkę szczypcami chirurgicznymi, zaś mięśnie oka odcina się przy użyciu zagiętych tępo zakończonych nożyczek. Nie można dopuścić do powstania uszkodzeń rogówki poprzez wywieranie na nią nadmiernego nacisku (tj. stosowania urządzeń kompresyjnych).
20. Po wyjęciu gałki ocznej z oczodołu należy pozostawić przyklepioną widoczną część nerwu wzrokowego. Po wyjęciu z oczodołu oko umieszcza się na podkładce chłonnej i odcina się migotkę i inne tkanki łączne.

21. Poddane enukleacji oko umieszcza się w uchwycie ze stali nierdzewnej, przy rogówce ustawionej pionowo. Uchwyt przenosi się następnie do komory urządzenia do przepłukiwania (16). Uchwyty należy umieścić w urządzeniu do przepłukiwania w taki sposób, by na całą rogówkę kapał izotoniczny roztwór soli. Komory urządzenia do przepłukiwania powinny utrzymywać temperaturę $32 \pm 1,5$ °C. Dodatek 3 zawiera schemat budowy typowego urządzenia do przepłukiwania i uchwytów na oczy, które można nabyć na rynku lub zbudować samodzielnie. Urządzenie można tak zmodyfikować, aby spełniało potrzeby konkretnego laboratorium (np. poprzez dostosowanie liczby oczu).
22. Po umieszczeniu w urządzeniu do przepłukiwania oczy bada się ponownie przy użyciu mikroskopu z lampą szczelinową w celu sprawdzenia, czy nie zostały one uszkodzone podczas procedury wycinania. W tym momencie należy również zmierzyć grubość rogówki na jej wierzchołku przy zastosowaniu urządzenia do pomiaru głębokości połączonego z mikroskopem z lampą szczelinową. Należy zastąpić oczy (i) o wyniku zatrzymania fluoresceiny $> 0,5$; (ii) o zmętnieniu rogówki $> 0,5$ lub (iii) noszące jakiegokolwiek ślady uszkodzenia. Oczy, które nie zostały odrzucone ze względu na jedno z powyższych kryteriów, należy odrzucić jeśli grubość ich rogówki różni się o ponad 10 % od średniej wartości dla wszystkich oczu. Użytkownicy powinni być świadomi, że mikroskopy z lampami szczelinowymi mogą dawać różne wyniki pomiaru grubości rogówki, jeśli stosuje się różne ustawienia szczeliny. Szerokość szczeliny powinna wynosić 0,095 mm.
23. Po zbadaniu i dopuszczeniu wszystkich oczu są one inkubowane przez ok. 45 do 60 minut w celu zrównoważenia ich z układem badawczym przed dawkowaniem substancji. Po okresie inkubacji rejestruje się zerowy pomiar referencyjny grubości rogówki i jej zmętnienia, który służy jako punkt odniesienia (tj. czas = 0). Wynik pomiaru fluoresceiny określony w momencie wycinania stosuje się jako pomiar odniesienia dla tego punktu końcowego.

Podanie substancji badanej

24. Natychmiast po dokonaniu zerowych pomiarów referencyjnych oko (w pojemniku) wyjmuje się z urządzenia do przepłukiwania i ustawia w pozycji poziomej, a na rogówkę aplikuje się badaną substancję.
25. Substancje ciekłe bada się zwykle w stanie nierozcieńczonym, można je jednak w razie potrzeby rozcieńczyć (np. w części badania). Preferowanym rozpuszczalnikiem w przypadku substancji rozcieńczanych jest sól fizjologiczna. Można jednak stosować również alternatywne rozpuszczalniki w kontrolowanych warunkach badania, ale zasadność zastosowania rozpuszczalników innych niż sól fizjologiczna należy udowodnić.
26. Badane substancje ciekłe aplikuje się na rogówkę w taki sposób, by cała powierzchnia rogówki była równomiernie pokryta badaną substancją; standardowa ilość wynosi 0,03 ml.
27. Ciała stałe należy w miarę możliwości jak najdokładniej rozdrobnić w moździerzu lub podobnym urządzeniu rozdrabniającym. Proszek należy zaaplikować na rogówkę w taki sposób, by jej powierzchnia była równomiernie pokryta badaną substancją; standardowa ilość wynosi 0,03 g.
28. Badaną substancję (ciecz lub ciało stałe) pozostawia się przez 10 sekund, a następnie zmywa z oka izotonicznym roztworem soli (w ilości ok. 20 ml) w temperaturze otoczenia. Oko (w pojemniku) umieszcza się następnie ponownie w urządzeniu do przepłukiwania w pierwotnej pozycji pionowej.

Substancje kontrolne

29. Każde doświadczenie powinno obejmować równoczesną kontrolę negatywną lub kontrolę z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika i kontrolę pozytywną.
30. W przypadku badania cieczy o stężeniu 100 % lub ciał stałych w metodzie badania ICE jako równoczesną kontrolę negatywną stosuje się sól fizjologiczną w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zagwarantowania, że warunki badania nie wywołują w niewłaściwy sposób reakcji w postaci podrażnienia.
31. W przypadku badania cieczy rozcieńczonych w metodzie badania uwzględnia się równoczesną kontrolę z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika w celu wykrycia niespecyficznych zmian w układzie badawczym i zagwarantowania, że warunki badania nie wywołują w niewłaściwy sposób reakcji w postaci podrażnienia. Jak stwierdzono w pkt 25 można stosować jedynie rozpuszczalnik/nośnik, w odniesieniu do którego wykazano, że nie wpływa negatywnie na układ badawczy.

32. W każdym doświadczeniu uwzględnia się substancję o znanym działaniu drażniącym dla oczu służącą do przeprowadzenia równoczesnej kontroli pozytywnej w celu zweryfikowania, czy wywołana została właściwa reakcja. Ponieważ w niniejszej metodzie badania stosuje się badanie ICE w celu zidentyfikowania substancji żrących i silnie drażniących, w idealnej sytuacji do kontroli pozytywnej powinna być użyta substancja referencyjna, która wywołuje silną reakcję w tej metodzie badania. Aby jednak zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli pozytywnej w czasie, podrażnienie nie powinno być nadmierne. Należy wyprodukować wystarczające dane *in vitro* do kontroli pozytywnej, aby można było obliczyć określony statystycznie dopuszczalny zakres kontroli pozytywnej. Jeżeli dla konkretnej kontroli pozytywnej nie istnieją odpowiednie dane historyczne z badań ICE, może zająć konieczność przeprowadzenia badań w celu dostarczenia tych informacji.
33. Do celów kontroli pozytywnej w przypadku badanych cieczy można zastosować na przykład 10 % kwas octowy lub 5 % roztwór chlorku benzalkonium, zaś do kontroli pozytywnej dla badanych ciał stałych - na przykład wodorotlenek sodu lub imidazol.
34. Substancje wzorcowe są przydatne do oceny potencjalnego działania drażniącego dla oczu nieznanymi chemikaliów z określonej klasy chemicznej lub produktowej lub do oceny względnego potencjalnego działania drażniącego substancji drażniącej dla oczu w określonym zakresie reakcji w postaci podrażnienia.

Pomiar punktów końcowych

35. Rogówki poddane działaniu badanej substancji ocenia się przed podaniem tej substancji, a następnie po 30, 75, 120, 180 i 240 minutach (± 5 minut) od płukania po podaniu substancji badanej. Te punkty czasowe zapewniają odpowiednią liczbę pomiarów w trakcie czterogodzinnego okresu badania, pozostawiając jednocześnie odpowiednią ilość czasu pomiędzy pomiarami na dokonanie koniecznych obserwacji wszystkich oczu.
36. Oceniane punkty końcowe to zmętnienie rogówki, obrzęk, zatrzymanie fluoresceiny i zmiany morfologiczne (np. wżery lub rozluźnienie nabłonka przedniego). Wszystkie punkty końcowe, z wyjątkiem zatrzymania fluoresceiny (które określa się wyłącznie przed podaniem materiału działaniu badanej substancji oraz 30 minut po nim), ustalane są we wszystkich wymienionych punktach czasowych.
37. Zaleca się wykonanie fotografii celem udokumentowania zmętnienia rogówki, zatrzymania fluoresceiny, zmian morfologicznych oraz histopatologii, jeśli jest przeprowadzana.
38. Zachęca się użytkowników, by po ostatniej ocenie po czterech godzinach zachowali oczy w odpowiednim środku utrwalającym (np. obojętnej buforowanej formalinie) na potrzeby ewentualnego badania histopatologicznego.
39. Obrzęk rogówki określa się na podstawie pomiaru grubości rogówki dokonywanego przy użyciu pachymetru optycznego w mikroskopie z lampą szczelinową. Wartość tę wyraża się procentowo i oblicza się ją na podstawie pomiarów grubości rogówki według poniższego wzoru:

$$\left(\frac{\text{grubość rogówki w czasie } t - \text{grubość rogówki w czasie } t = 0}{\text{grubość rogówki w czasie } = 0} \right) \times 100$$

40. Średnią wartość procentową obrzęku rogówki we wszystkich oczach poddanych badaniu oblicza się w oparciu o wszystkie punkty czasowe obserwacji. W oparciu o najwyższy średni wynik obrzęku rogówki zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym podaje się ogólny wynik dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji.
41. Zmętnienie rogówki oblicza się przy zastosowaniu najbardziej zmętniałej powierzchni rogówki. Średnią wartość procentową zmętnienia rogówki we wszystkich oczach poddanych badaniu oblicza się w oparciu o wszystkie punkty czasowe obserwacji. W oparciu o najwyższy średni wynik zmętnienia rogówki zaobserwowany w dowolnym punkcie czasowym podaje się ogólny wynik dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji (tabela 1).

Tabela 1

Wyniki oceny zmętnienia rogówki

Wynik	Obserwacja
0	Brak zmętnienia
0,5	Nieznaczne zmętnienie

Wynik	Obserwacja
1	Obszary pojedyncze lub rozproszone; elementy tęczówki są wyraźnie widoczne
2	Obszar półprzezroczysty jest wyraźnie widoczny; elementy tęczówki są nieco zamazane
3	Poważne zmętnienie rogówki; nie są widoczne żadne konkretne elementy tęczówki; bardzo trudno jest określić wielkość źrenicy
4	Całkowite zmętnienie rogówki; tęczówka jest niewidoczna

42. Średni poziom zatrzymania fluoresceiny we wszystkich badanych oczach oblicza się wyłącznie w punkcie czasowym po 30 minutach; wartość tę stosuje się do określenia ogólnego wyniku dla kategorii w odniesieniu do każdej badanej substancji (tabela 2).

Tabela 2
Wyniki zatrzymania fluoresceiny

Wynik	Obserwacja
0	Brak zatrzymania fluoresceiny
0,5	Nieznaczone wybarwienie pojedynczych komórek
1	Wybarwienie pojedynczych komórek rozproszone na całym obszarze rogówki poddanym działaniu substancji
2	Ogniskowe lub łączące się zwarte wybarwienie pojedynczych komórek
3	Łączące się duże obszary rogówki zatrzymują fluoresceinę

43. Zmiany morfologiczne obejmują »wzery« komórek nabłonka przedniego, »rozluźnienie« nabłonka przedniego, »stwardnienie« powierzchni rogówki oraz »przyleganie« badanej substancji do rogówki. Ustalenia te mogą się różnić między sobą stopniem zaawansowania i mogą występować jednocześnie. Klasyfikacja tych ustaleń jest subiektywna i zależy od interpretacji osoby badającej.

DANE I SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Ocena danych

44. Wyniki badania zmętnienia rogówki, obrzęku rogówki i zatrzymania fluoresceiny należy oceniać osobno, tak aby wygenerować klasę ICE dla każdego punktu końcowego. Klasy ICE w odniesieniu do każdego punktu końcowego są następnie łączone w celu uzyskania Klasyfikacji Działania Drażniącego dla Oczu dla każdej badanej substancji.

Kryteria decyzji

45. Po dokonaniu oceny każdego punktu końcowego można przypisać klasy ICE w oparciu o wcześniej ustalony zakres. Interpretacji wyników grubości rogówki (tabela 3), zmętnienia (tabela 4) i zatrzymania fluoresceiny (tabela 5) z zastosowaniem czterech klas ICE dokonuje się na podstawie następujących skal:

Tabela 3
Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do grubości rogówki

Średni obrzęk rogówki (%) (*)	Klasa ICE
0–5	I
> 5–12	II
> 12–18 (> 75 min po podaniu substancji)	II
> 12–18 (≤ 75 min po podaniu substancji)	III
> 18–26	III

Średni obrzęk rogówki (%) (*)	Klasa ICE
> 26–32 (> 75 min po podaniu substancji)	III
> 26–32 (≤ 75 min po podaniu substancji)	IV
> 32	IV

(*) Wyniki dotyczące obrzęku rogówki mają zastosowanie, wyłącznie jeżeli jej grubość mierzy się przy użyciu mikroskopu z lampą szczelinową Haag-Streit BP900 z urządzeniem pomiarowym nr I, przy ustawieniu szczeliny na 9½, co odpowiada 0,095 mm. Użytkownicy powinni być świadomi, że mikroskopy z lampami szczelinowymi mogą dawać różne wyniki pomiaru grubości rogówki, jeżeli stosuje się różne ustawienia szczeliny.

Tabela 4

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do zmętnienia

Średni maksymalny wynik zmętnienia (*)	Klasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Zob. tabela 1.

Tabela 5

Kryteria klasyfikacji ICE w odniesieniu do zatrzymania fluoresceiny

Średni wynik zatrzymania fluoresceiny 30 minut po podaniu substancji (*)	Klasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Zob. tabela 2.

46. Ogólną klasyfikację działania drażniącego *in vitro* badanej substancji ocenia się poprzez odczyt kategorii działania drażniącego odpowiadającej połączeniu kategorii otrzymanych w odniesieniu do obrzęku rogówki, zmętnienia rogówki i zatrzymania fluoresceiny oraz zastosowanie schematu przedstawionego w tabeli 6.

Tabela 6

Ogólna klasyfikacja działania drażniącego *in vitro*

Kategoria	Połączenie 3 punktów końcowych
Substancja o działaniu żrącym / silnie drażniącym	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zmętnienie rogówki ≥ 3 po 30 min (w przynajmniej 2 oczu) Zmętnienie rogówki = 4 po 30 min (w przynajmniej 2 oczu) Znaczne rozluźnienie nabłonka przedniego (w przynajmniej 1 oku)

(*) Mniej prawdopodobne połączenia.

47. Zgodnie z treścią pkt 1, jeżeli badana substancja nie została zidentyfikowana jako żrąca lub silnie drażniąca dla oczu, należy przeprowadzić dodatkowe badanie do celów klasyfikacji i oznakowania. Metoda badania ICE wykazuje ogólną dokładność od 83 % (120/144) do 87 % (134/154), odsetek wyników fałszywie dodatnich od 6 % (7/122) do 8 % (9/116), odsetek wyników fałszywie ujemnych od 41 % (13/32) do 50 % (15/30) w odniesieniu do identyfikacji substancji żrących i silnie drażniących dla oczu w porównaniu do danych uzyskanych w wyniku metody badania *in vivo* na oku królika, sklasyfikowanych zgodnie z systemami klasyfikacji EPA (1), UE (2) lub GHS (3). Jeżeli substancje należące do określonych klas chemicznych (tj. alkohole i substancje powierzchniowo czynne) lub fizycznych (tj. ciała stałe) są wyłączone z bazy danych, dokładność badania ICE wg systemów klasyfikacji UE, EPA i GHS wynosi od 91 % (75/82) do 92 % (69/75), odsetek wyników fałszywie dodatnich – od 5 % (4/73) do 6 % (4/70), a odsetek wyników fałszywie ujemnych – od 29 % (2/7) do 33 % (3/9) (4).
48. Nawet jeżeli badana substancja nie zostanie zaklasyfikowana jako żrąca lub silnie drażniąca dla oczu, dane z badania ICE mogą być przydatne, w połączeniu z danymi z badania *in vivo* na oku królika lub z innego odpowiednio zwalidowanego badania *in vitro*, w celu dalszej oceny przydatności i ograniczeń metody badania ICE w odniesieniu do identyfikacji substancji o słabym działaniu drażniącym i substancji niedrażniących (trwają prace nad dokumentem zawierającym wytyczne dotyczące stosowania metod badania toksyczności dla oczu *in vitro*).

Kryteria dopuszczalności badania

49. Badanie uznaje się za dopuszczalne, jeżeli równoczesna kontrola negatywna / kontrole z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika oraz równoczesna kontrola pozytywna daje wyniki w klasyfikacji działania drażniącego mieszczące się odpowiednio w ramach klas substancji niedrażniących i silnie drażniących/żrących.

Sprawozdanie z badania

50. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje, o ile są one istotne dla przebiegu badania:

Substancje badane i kontrolne

Nazwa chemiczna (nazwy chemiczne), np. nazwa strukturalna używana przez Chemical Abstracts Service (CAS), po której następują inne nazwy, jeżeli są znane;

Numer CAS, jeżeli jest znany;

Czystość i skład substancji lub mieszaniny (w procentach masy), w miarę dostępności tych informacji;

Właściwości fizykochemiczne istotne dla przebiegu badania, np. stan skupienia, lotność, pH, stabilność, klasa chemiczna, rozpuszczalność w wodzie;

W stosownych przypadkach obróbka substancji badanych/kontrolnych przed badaniem (np. ogrzanie, rozdrobnienie);

Stabilność, jeżeli jest znana.

Informacje dotyczące sponsora i placówki przeprowadzającej badanie

Nazwa i adres sponsora i placówki przeprowadzającej badanie oraz dane kierownika badań;

Identyfikacja źródła oczu (tj. zakład, w którym je pobrano);

Warunki przechowywania i transportu oczu (np. data i czas pobrania oczu, odstęp czasu między pobraniem oczu a rozpoczęciem badania);

W miarę dostępności szczegółowe dane na temat zwierząt, od których pobrano oczy (np. wiek, płeć, masa zwierzęcia dawcy).

Uzasadnienie zastosowanej metody badania i protokołu

Integralność metody badania

Procedura zastosowana w celu zapewnienia integralności (tj. dokładności i wiarygodności) metody badania w czasie (np. okresowe badanie substancji do oceny biegułości, wykorzystanie historycznych danych z kontroli negatywnej i pozytywnej).

Kryteria dotyczące badania dopuszczalnego

W stosownych przypadkach akceptowalny zakres równoczesnej kontroli odniesienia na podstawie danych historycznych.

Warunki badania

Opis zastosowanego układu badawczego;

Zastosowany mikroskop z lampą szczelinową (np. model);

Zastosowane ustawienia mikroskopu z lampą szczelinową;

Informacje na temat zastosowanych oczu kurzych, w tym oświadczenia dotyczące ich jakości;

Szczegółowe dane na temat zastosowanej procedury badania;

Zastosowane stężenie badanej substancji;

Opis wszelkich modyfikacji procedury badania;

Odniesienie do danych historycznych dotyczących modelu (np. kontrole pozytywne i negatywne, substancje do oceny biegłości, substancje wzorcowe);

Opis stosowanych kryteriów oceny.

Wyniki

Opis innych zaobserwowanych skutków;

W razie potrzeby fotografie oka.

Omówienie wyników

Wnioski

LITERATURA

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1.
- (3) Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) (2007). Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS), wydanie drugie zmienione, ONZ, Nowy Jork i Genewa 2007. Dostępne na stronie internetowej:

[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). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej:

[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. Dostępne na stronie internetowej:

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

- (6) Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html\]](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. W: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Intera-gency 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). Publikacja NIH nr: 07-4517. Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](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. Publikacja NIH nr: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm\]](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). Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](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 Health-care Settings. Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf\]](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. Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](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. Dostępne na stronie internetowej:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)

Dodatek 1

DEFINICJE

Dokładność: bliskość zgodności pomiędzy wynikami zastosowania metody badania a przyjętymi wartościami odniesienia. Jest to miara efektywności metody badania i jeden z aspektów jej „istotności”. Pojęcia tego często używa się zamiennie z pojęciem „zgodność” na oznaczenie odsetka prawidłowych wyników uzyskiwanych przy użyciu metody badania.

Substancja wzorcowa: substancja używana jako wzorzec do porównań z badaną substancją. Substancja wzorcowa powinna mieć następujące cechy: (i) stałe i wiarygodne źródło(-a); (ii) podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do badanej klasy substancji; (iii) znane właściwości fizyczne/chemiczne; (iv) dane uzupełniające dotyczące znanych skutków oraz (v) znaną siłę działania w zakresie pożądanych reakcji.

Rogówka: przezroczysta warstwa w przedniej części gałki ocznej, która okrywa tęczówkę i źrenicę oraz wpuszcza światło do wnętrza oka.

Zmętnienie rogówki: pomiar stopnia zmętnienia rogówki wskutek ekspozycji na badaną substancję. Zwiększone zmętnienie rogówki wskazuje na jej uszkodzenie.

Obrzęk rogówki: obiektywny pomiar stopnia rozdęcia rogówki w następstwie ekspozycji na badaną substancję w badaniu ICE. Obrzęk rogówki wyraża się procentowo i oblicza się go na podstawie wyjściowych pomiarów grubości rogówki (sprzed podania substancji) i grubości mierzonej w równych odstępach czasu po ekspozycji na badaną substancję w badaniu ICE. Stopień obrzęku rogówki wskazuje na uszkodzenie rogówki.

Kategoria I EPA: działanie żrące (nieodwracalne uszkodzenie tkanki oka) lub zmiany rogówkowe lub podrażnienie rogówki utrzymujące się dłużej niż 21 dni (1).

Kategoria R41 UE: spowodowanie uszkodzenia tkanki w oku lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia w następstwie nałożenia badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które nie jest całkowicie odwracalne w ciągu 21 dni od nałożenia (2).

Odsetek wyników fałszywie ujemnych: odsetek wszystkich obecnych substancji fałszywie zidentyfikowanych w wyniku zastosowania metody badania jako nieobecne. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badania.

Odsetek wyników fałszywie dodatnich: odsetek wszystkich nieobecnych substancji fałszywie zidentyfikowanych w wyniku zastosowania metody badania jako obecne. Jest to jeden ze wskaźników efektywności metody badania.

Zatrzymanie fluoresceiny: subiektywny pomiar ilości soli fluoresceiny zatrzymanej w komórkach nabłonka przedniego rogówki w następstwie ekspozycji na badaną substancję w badaniu ICE. Stopień zatrzymania fluoresceiny wskazuje na uszkodzenie nabłonka przedniego rogówki.

GHS (Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów): system proponujący klasyfikację chemikaliów (substancji i mieszanin) według znormalizowanych rodzajów i poziomów zagrożeń fizycznych, zdrowotnych i środowiskowych oraz omawiający odpowiednie elementy komunikacyjne, takie jak piktogramy, hasła ostrzegawcze, zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia, zwroty wskazujące środki ostrożności i karty charakterystyki substancji i produktów niebezpiecznych, aby przekazać informacje na temat ich działań niepożądanych w celu zapewnienia ochrony ludzi (w tym pracowników, robotników, przewoźników, konsumentów i ratowników) i środowiska (3).

Kategoria 1 GHS: spowodowanie uszkodzenia tkanki w oku lub poważne fizyczne pogorszenie widzenia w następstwie nałożenia badanej substancji na przednią powierzchnię oka, które nie jest całkowicie odwracalne w ciągu 21 dni od nałożenia (3).

Zagrożenie: nieodłączna właściwość czynnika lub sytuacja, która może potencjalnie doprowadzić do negatywnych skutków w przypadku ekspozycji organizmu, systemu lub (sub)populacji na taki czynnik.

Kontrola negatywna: replikat niepoddany działaniu badanej substancji, zawierający wszystkie składniki układu badawczego. Próbka ta jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia, czy rozpuszczalnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Niedrażniące: substancje, które nie zostały zaklasyfikowane do kategorii I, II lub III EPA, kategorii R41 lub R36 UE lub kategorii 1, 2A lub 2B GHS jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Żrące dla oczu: a) substancja, która powoduje nieodwracalne uszkodzenie tkanki w oku; b) substancje, które zaklasyfikowano do kategorii 1 GHS, kategorii I EPA lub kategorii R41 UE jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Drażniące dla oczu: a) substancja, która powoduje odwracalną zmianę w oku w następstwie jej nałożenia na przednią powierzchnię oka; b) substancje, które zaklasyfikowano do kategorii II lub III EPA, kategorii R36 UE lub kategorii 2A lub 2B GHS jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Silnie drażniące dla oczu: a) substancja, która powoduje zmianę w oku w następstwie jej nałożenia na przednią powierzchnię oka, która nie ustępuje w ciągu 21 dni od nałożenia lub powoduje poważne fizyczne pogorszenie widzenia; b) substancje, które zaklasyfikowano do kategorii I GHS, kategorii I EPA lub kategorii R41 UE jako drażniące dla oczu (1)(2)(3).

Kontrola pozytywna: replikat zawierający wszystkie składniki układu badawczego, który został poddany działaniu substancji, o której wiadomo, że wywoła reakcję dodatnią. Aby zapewnić możliwość oceny zmienności reakcji w kontroli pozytywnej w czasie, podrażnienie nie powinno być nadmierne.

Wiarygodność: miary zakresu, w jakim metoda badania może zostać wykonana w sposób odtwarzalny w jednym laboratorium i pomiędzy laboratoriami w czasie, w przypadku jej wykonywania przy użyciu tego samego protokołu. Ocenia się ją poprzez obliczenie odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej oraz powtarzalności wewnątrzlaboratoryjnej.

Mikroskop z lampą szczelinową: narzędzie używane do bezpośredniego badania oka w powiększeniu pod mikroskopem dwuokularowym poprzez uzyskanie prostego obrazu stereoskopowego. W metodzie badania ICE narzędzie to stosuje się do oglądania przednich struktur oka kurzego, jak również do obiektywnego pomiaru grubości rogówki za pomocą urządzenia do pomiaru grubości połączonego z mikroskopem.

Kontrola z zastosowaniem rozpuszczalnika/nośnika: próbka niepoddana działaniu badanej substancji, zawierająca wszystkie składniki układu badawczego, w tym rozpuszczalnik lub nośnik, która jest przetwarzana razem z próbkami poddanymi działaniu badanej substancji oraz z innymi próbkami kontrolnymi w celu określenia wyjściowej reakcji dla próbek poddanych działaniu badanej substancji rozpuszczonej w tym samym rozpuszczalniku lub nośniku. Jeżeli równocześnie przeprowadza się kontrolę negatywną, próbka ta wykazuje również, czy rozpuszczalnik lub nośnik wchodzi w reakcję z układem badawczym.

Badanie wielopoziomowe: stopniowa strategia badawcza, zgodnie z którą wszystkie istniejące informacje na temat badanej substancji są analizowane na każdym etapie w określonym porządku z zastosowaniem procesu uwzględniającego wagę dowodów w celu określenia, czy dostępna jest wystarczająca ilość informacji do podjęcia decyzji o klasyfikacji zagrożenia, przed przejściem do następnego etapu. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji można przypisać badanej substancji potencjał wywołania podrażnienia, dodatkowe badania nie są potrzebne. Jeżeli na podstawie dostępnych informacji nie można przypisać badanej substancji potencjału wywołania podrażnienia, przeprowadza się procedurę stopniowych badań sekwencyjnych na zwierzętach do momentu, aż będzie możliwe dokonanie jednoznacznej klasyfikacji.

Zwalidowana metoda badania: metoda badania, w odniesieniu do której zakończono badania walidacyjne w celu określenia jej istotności (w tym dokładności) i wiarygodności w odniesieniu do konkretnego celu. Należy zauważyć, że zwalidowana metoda badania może nie wykazywać dostatecznej efektywności z punktu widzenia istotności i wiarygodności, aby można było ją uznać za dopuszczalną w odniesieniu do danego celu.

Waga dowodów: proces analizowania mocnych i słabych stron różnych elementów informacji podczas formułowania wniosku dotyczącego potencjalnego zagrożenia stwarzanego przez daną substancję oraz uzasadnienia takiego wniosku.

Dodatek 2

CHEMIKALIA DO OCENY BIEGŁOŚCI W ODNIESIENIU DO METODY BADANIA ICE

Przed rozpoczęciem rutynowego stosowania metody badania zgodnej z niniejszą metodą badania laboratoria mogą podjąć się wykazania swojej biegłości technicznej prawidłowo identyfikując klasyfikację stopnia działania żrącego 10 substancji wskazanych w tabeli 1. Substancje te zostały wybrane w taki sposób, by reprezentowały zakres reakcji na miejscowe działanie drażniące/żrące dla oczu oparty na wynikach badania *in vivo* na oku królika (TG 405) (np. kategorie 1, 2A, 2B lub nieklasyfikowane ani nieoznakowane zgodnie z GHS ONZ) (3)(7). Biorąc pod uwagę zwalidowaną użyteczność tych badań (tj. wyłącznie do zidentyfikowania substancji żrących/silnie drażniących dla oczu), istnieją jednak tylko dwa wykazujące efektywność wyniki badań dla potrzeb klasyfikacji (substancja żrąca/drażniąca lub substancja nieżrąca/niedrażniąca). Innymi kryteriami doboru były: dostępność handlowa substancji, wysoka jakość dostępnych danych referencyjnych z badań *in vivo* oraz istnienie wysokiej jakości danych dotyczących dwóch metod *in vitro*, w odniesieniu do których przygotowuje się wytyczne dotyczące badań. Z tego powodu substancje drażniące wybrano z zalecanego przez Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Uznawania Metod Alternatywnych (ICCVAM) wykazu 122 substancji referencyjnych do walidacji metod badań *in vitro* toksyczności dla oczu (zob. dodatek H: Wykaz substancji referencyjnych zalecanych przez ICCVAM) (4). Dane referencyjne znaleźć można w dokumentach przeglądowych ICCVAM dla metod badania zmętnienia i przepuszczalności rogówki u bydła (BCOP) oraz badania ICE (18)(19).

Tabela 1

Zalecane substancje do oceny biegłości technicznej w odniesieniu do badania ICE

Substancja chemiczna	Nr CAS	Substancja chemiczna (1)	Stan skupienia	Klasyfikacja <i>in vivo</i> (2)	Klasyfikacja <i>in vitro</i> (3)
Chlorek benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Związek oniowy	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Chloroheksydyna	55-56-1	Amina, amidyna	Ciało stałe	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Kwas dibenzoilo-1-winowy	2743-38-6	Kwas karboksylowy, ester	Ciało stałe	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Imidazol	288-32-4	Związek heterocykliczny	Ciało stałe	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Kwas trichlorooctowy (30 %)	76-03-9	Kwas karboksylowy	Ciecz	Kategoria 1	Substancja żrąca/ Substancja silnie drażniąca
Chlorek 2,6-dichlorobenzoilu	4659-45-4	Halogenek acylu	Ciecz	Kategoria 2A	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
2-etylo-acetyloctan metylu	609-14-3	Keton, ester	Ciecz	Kategoria 2B	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
Azotan amonu	6484-52-2	Sól nieorganiczna	Ciało stałe	Kategoria 2A	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
Glicerol	56-81-5	Alkohol	Ciecz	Nieoznakowana	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym
n_heksan	110-54-3	Węglowodór (acykliczny)	Ciecz	Nieoznakowana	Substancja nieżrąca/ Substancja o słabym działaniu drażniącym

Skróty: Nr CAS = numer w Chemical Abstracts Service

(1) Klasy chemiczne przypisano do każdej badanej substancji z zastosowaniem standardowego schematu klasyfikacji w oparciu o system klasyfikacji Medical Subject Headings (MeSH) opracowany przez National Library of Medicine (dostępny pod adresem <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).(2) W oparciu o wyniki badania *in vivo* na oku królika (OECD TG 405) i z zastosowaniem GHS ONZ (3)(7).

(3) W oparciu o wyniki badań BCOP i ICE.

Dodatek 3

Schematy budowy urządzenia do przepłukiwania i uchwytów na oczy stosowanych w badaniu ICE

(Zob. Burton i in. (17), aby uzyskać dodatkowe, ogólne opisy urządzenia do przepłukiwania i uchwytu na oko)

