

## ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 1152/2010 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 8ης Δεκεμβρίου 2010

σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH), με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη τη συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ<sup>(1)</sup>, και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008<sup>(2)</sup> της Επιτροπής περιέχει τις μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας ουσιών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.
- (2) Είναι αναγκαίο να επικαιροποιηθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 ώστε να συμπεριληφθούν κατά προτεραιότητα δύο νέες μέθοδοι δοκιμών *in vitro* για τον οφθαλμικό ερεθισμό, οι οποίες εγκρίθηκαν πρόσφατα από τον ΟΟΣΑ,

προκειμένου να επιτευχθεί μείωση του αριθμού των ζώων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα, σύμφωνα με την οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 24ης Νοεμβρίου 1986 για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς<sup>(3)</sup>. Ζητήθηκε η γνώμη των ενδιαφερομένων φορέων σχετικά με το παρόν σχέδιο.

- (3) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.
- (4) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που έχει συσταθεί δυνάμει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

## Άρθρο 1

Στο μέρος Β του παραρτήματος του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 προστίθενται τα κεφάλαια Β.47 και Β.48 που παρατίθενται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

## Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 8 Δεκεμβρίου 2010.

Για την Επιτροπή  
Ο Πρόεδρος  
José Manuel BARROSO

<sup>(1)</sup> ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1<sup>(2)</sup> ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1<sup>(3)</sup> ΕΕ L 358 της 18.12.1986, σ. 1.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## «B. 47 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΔΙΑΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η μέθοδος δοκιμών αδιαφάνειας (θολερότητας) και διαπερατότητας του κερατοειδούς βοοειδών (Bovine Corneal Opacity and Permeability/BCOP) αποτελεί μέθοδο δοκιμών *in vitro* που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό συγκεκριμένες περιστάσεις και περιορισμούς, για την ταξινόμηση ουσιών και μειγμάτων ως “διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών” (1) (2) (3). Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, ως ισχυρά ερεθιστικά ορίζονται οι ουσίες οι οποίες προκαλούν οφθαλμικές αλλοιώσεις που εμμένουν στο κουνέλι για τουλάχιστον 21 ημέρες μετά τη χορήγηση. Αν και δεν θεωρείται έγκυρη για την πλήρη αντικατάσταση της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια, η μέθοδος BCOP συνιστάται για χρήση στο πλαίσιο μιας στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών για τη κανονιστική ταξινόμηση και επισήμανση εντός συγκεκριμένου πεδίου εφαρμογής (4) (5). Οι ουσίες και τα μείγματα ελέγχου (6) μπορούν να ταξινομούνται ως διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά για τους οφθαλμούς χωρίς περαιτέρω δοκιμές σε κουνέλια. Μια ουσία που εμφανίζει αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή σε κουνέλια στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων, όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή 405 (7) του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (κεφάλαιο B. 5 του παρόντος παραρτήματος).
2. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της πιθανής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας μιας ελεγχόμενης ουσίας για τους οφθαλμούς, όπως μετράται από την ικανότητά της να προκαλεί αδιαφάνεια και αυξημένη διαπερατότητα σε απομονωμένο βόειο κερατοειδή. Οι τοξικές επιδράσεις στον κερατοειδή μετρώνται μέσω: (i) της μειωμένης μετάδοσης του φωτός (αδιαφάνεια) και (ii) της αυξημένης διέλευσης χρωστικής νατρίου φλουοροσκεϊνής (διαπερατότητα). Οι αξιολογήσεις της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία συνδυάζονται για να εξαχθεί βαθμολογία ερεθιστικότητας *in vitro* (In Vitro Irritancy Score/IVIS), η οποία χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση του βαθμού ερεθιστικότητας της ελεγχόμενης ουσίας.
3. Σε δοκιμές με τη μέθοδο BCOP έχουν υποβληθεί και ερεθιστικά των οφθαλμών που προκαλούν αλλοιώσεις οι οποίες υποχωρούν εντός διαστήματος μικρότερου των 21 ημερών, καθώς και μη ερεθιστικά. Πάντως, δεν έχει αξιολογηθεί επισήμως η ορθότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμής BCOP για ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις κατηγορίες.
4. Στο προσάρτημα 1 παρέχονται ορισμοί.

## ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών BCOP της Διυπηρεσιακής Συντονιστικής Επιτροπής για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM)(8), το οποίο καταρτίστηκε σύμφωνα με διεθνή μελέτη επικύρωσης (4)(5)(9), με τη συνεισφορά του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) και του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM). Το πρωτόκολλο βασίζεται σε στοιχεία που ελήφθησαν από το Ινστιτούτο Επιστημών In Vitro (IVIS) και το πρωτόκολλο INVITTOX 124 (10), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη προεπικύρωσης της δοκιμασίας BCOP που διενεργήθηκε κατά την περίοδο 1997-1998 με κοινοτική χρηματοδότηση. Αμφότερα αυτά τα πρωτόκολλα βασίζονται στη μεθοδολογία της δοκιμασίας BCOP που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Gautheron *et al.* (11).
6. Οι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για την παρούσα μέθοδο δοκιμών βασίζονται στα υψηλά ψευδοθετικά ποσοστά για τις αλκοόλες και τις κετόνες και στο υψηλό ψευδοαρνητικό ποσοστό για τα στερεά, που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων επικύρωσης (βλ. παράγραφο 44) (5). Όταν οι ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις χημικές και φυσικές κατηγορίες αποκλείονται από τη βάση δεδομένων, αυξάνεται σημαντικά η ορθότητα της δοκιμής BCOP στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της ΕΡΑ (Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ) και του GHS (Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων) (5). Για τον σκοπό της παρούσας δοκιμασίας (δηλ. τη ταυτοποίηση μόνο των διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), τα ψευδοαρνητικά ποσοστά δεν είναι κρίσιμης σημασίας, διότι οι ουσίες αυτές θα υποβληθούν ακολούθως σε δοκιμή σε κουνέλια ή σε άλλες επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές *in vitro*, ανάλογα με τις ρυθμιστικές απαιτήσεις, στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων με μέθοδο προσέγγισης βασιζόμενη στο βάρος της απόδειξης. Επιπλέον, η υφιστάμενη βάση δεδομένων επικύρωσης δεν καθιστά εφικτή τη δέουσα αξιολόγηση ορισμένων κατηγοριών χημικών ουσιών ή προϊόντων (π.χ. των μειγμάτων). Παρόλα αυτά, οι ερευνητές θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών για κάθε τύπο υλικού δοκιμής (συμπεριλαμβανομένων των μειγμάτων), με τα θετικά αποτελέσματα να θεωρούνται ενδεικτικά απόκρισης οφθαλμικής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας. Πάντως, τα θετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με αλκοόλες ή κετόνες πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή λόγω του κινδύνου υπερεκτιμημένης πρόβλεψης.
7. Όλες οι διαδικασίες με τους οφθαλμούς και τους κερατοειδείς βοοειδών πρέπει να συμμορφώνονται προς τους κανονισμούς και τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στην εγκατάσταση δοκιμής για τον χειρισμό υλικών ζωικής προέλευσης, περιλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, ιστών και ιστικών υγρών. Συνιστάται η τήρηση των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων (12).
8. Ένας περιορισμός της μεθόδου δοκιμών είναι ότι, αν και λαμβάνει υπόψη ορισμένες από τις επιδράσεις στους οφθαλμούς οι οποίες αξιολογήθηκαν στη μέθοδο δοκιμών οφθαλμικής ερεθιστικότητας σε κουνέλια και, εν μέρει, τη σοβαρότητά τους, δεν λαμβάνει υπόψη τους τραυματισμούς που επιπεφυκώδες και της ίριδας. Επίσης, μολονότι δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση αυτής καθαρής της αναστρέψιμότητας των αλλοιώσεων των κερατοειδούς στο πλαίσιο της δοκιμασίας BCOP, έχει προταθεί, βάσει των οφθαλμικών μελετών σε κουνέλια, η αξιολόγηση του αρχικού βάθους του τραύματος του κερατοειδούς για τη διάκριση μεταξύ μη αναστρέψιμων και αναστρέψιμων επιδράσεων (13). Τέλος, η BCOP δεν καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του δυναμικού συστημικής τοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση των οφθαλμών.

9. Συνεχίζονται οι προσπάθειες για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της χρησιμότητας και των περιορισμών της δοκιμασίας BCOP ως προς τον προσδιορισμό των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών ουσιών (βλ. επίσης παράγραφο 45). Οι χρήστες ενθαρρύνονται επίσης να παρέχουν δείγματα ή/και δεδομένα σε φορείς επικύρωσης, για μια επίσημη αξιολόγηση των πιθανών μελλοντικών χρήσεων της μεθόδου δοκιμών BCOP, καθώς και για την ταυτοποίηση των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών.
10. Τα εργαστήρια που εκτελούν για πρώτη φορά τη συγκεκριμένη δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 2. Τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιούν αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδείξουν την τεχνική ικανότητά τους όσον αφορά τη εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών BCOP πριν από την υποβολή δεδομένων από τη δοκιμασία BCOP, για τη κανονιστική ταξινόμηση των κινδύνων.

#### ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

11. Η μέθοδος δοκιμών BCOP είναι ένα οργανοτυπικό μοντέλο που εξασφαλίζει βραχυπρόθεσμη διατήρηση της κανονικής φυσιολογικής και βιοχημικής λειτουργίας του βόειου κερατοειδούς *in vitro*. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών, η βλάβη που προκαλείται από την ελεγχόμενη ουσία αξιολογείται μέσω ποσοτικών μετρήσεων των μεταβολών στην αδιαφάνεια (θολερότητα) και στη διαπερατότητα του κερατοειδούς, με τη χρήση αδιαφανομέτρου και φασματοφωτομέτρου ορατού φωτός, αντιστοίχως. Αμφότερες οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό βαθμολογίας ερεθιστικότητας *in vitro* (IVIS), η οποία χρησιμοποιείται για την κατάταξη σε κατηγορία ταξινόμησης κινδύνου ερεθιστικότητας *in vitro*, με σκοπό την πρόβλεψη του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού *in vivo* για την ελεγχόμενη ουσία (βλ. κριτήρια απόφασης).
12. Στη μέθοδο δοκιμής BCOP χρησιμοποιούνται κερατοειδείς που απομονώνονται από τους οφθαλμούς προσφάτως σφαχθέντων βοοειδών. Η κερατοειδική αδιαφάνεια μετράται ποσοτικά ως η ποσότητα φωτός που μεταδίδεται μέσω του κερατοειδούς. Η διαπερατότητα μετράται ποσοτικά ως η ποσότητα χρωστικής νατριούχου φλουορεσκαΐνης που διέρχεται από το πλήρες πάχος του κερατοειδούς, όπως ανιχνεύεται στο θρεπτικό υλικό του οπίσθιου θαλάμου. Οι ελεγχόμενες ουσίες εφαρμόζονται στην επιθηλιακή επιφάνεια του κερατοειδούς με προσθήκη στον εμπρόσθιο θάλαμο της διάταξης συγκράτησης του κερατοειδούς. Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται περιγραφή και διάγραμμα διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμής BCOP. Οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς κυκλοφορούν στο εμπόριο ή κατασκευάζονται κατά παραγγελία.

#### Πρόελευση και ηλικία των οφθαλμών βοοειδών και επιλογή ζωικών ειδών

13. Τα βοοειδή που αποστέλλονται στα σφαγεία θανατώνονται συνήθως για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για άλλες εμπορικές χρήσεις. Οι κερατοειδείς που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής BCOP προέρχονται μόνο από υγιή ζώα που θεωρούνται κατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Δεδομένου ότι το βάρος των βοοειδών ποικίλλει ανάλογα με τη φυλή, την ηλικία και το φύλο, δεν υπάρχει συνιστώμενο βάρος του ζώου κατά τη σφαγή.
14. Όταν χρησιμοποιούνται οφθαλμοί ζώων διαφορετικών ηλικιών ενδέχεται να προκύψουν διακυμάνσεις των διαστάσεων του κερατοειδούς. Οι κερατοειδείς με οριζόντια διάμετρο  $> 30,5$  mm και κεντρικό πάχος (CCT)  $\geq 1100$   $\mu\text{m}$  προέρχονται γενικά από βοοειδή ηλικίας άνω των οκτώ ετών, ενώ οι κερατοειδείς με οριζόντια διάμετρο  $< 28,5$  mm και CCT  $< 900$   $\mu\text{m}$  προέρχονται συνήθως από βοοειδή ηλικίας κάτω των πέντε ετών (14). Για τον λόγο αυτό, συνήθως δεν χρησιμοποιούνται οφθαλμοί βοοειδών ηλικίας άνω των 60 μηνών. Κατά κανόνα δεν χρησιμοποιούνται ούτε οφθαλμοί βοοειδών ηλικίας κάτω των 12 μηνών, διότι οι οφθαλμοί αυτοί δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως και το πάχος και η διάμετρος του κερατοειδούς υπολείπονται σημαντικά των τιμών που αναφέρονται σε οφθαλμούς ενήλικων βοοειδών. Εντούτοις, επιτρέπεται η χρήση κερατοειδών νεαρών ζώων (6 έως 12 μηνών) επειδή παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η αυξημένη διαθεσιμότητα, το περιορισμένο ηλικιακό εύρος και οι μειωμένοι κίνδυνοι πιθανής έκθεσης των εργαζομένων στη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (15). Δεδομένου ότι κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασης του μεγέθους ή του πάχους του κερατοειδούς στον βαθμό απόκρισης στις διαβρωτικές και ερεθιστικές ουσίες, συνιστάται στους χρήστες να αναφέρουν την εκτιμώμενη ηλικία ή/και το βάρος των ζώων από τα οποία προέρχονται οι κερατοειδείς που χρησιμοποιούνται στις μελέτες.

#### Συλλογή και μεταφορά των οφθαλμών στο εργαστήριο

15. Οι οφθαλμοί συλλέγονται από υπαλλήλους των σφαγείων. Για την ελαχιστοποίηση μηχανικών και άλλων φθορών των οφθαλμών, οι οφθαλμοί πρέπει να εξορύσσονται το συντομότερο μετά τη θανάτωση. Για την αποφυγή έκθεσης των οφθαλμών σε πιθανώς ερεθιστικές ουσίες, οι υπάλληλοι των σφαγείων δεν πρέπει να χρησιμοποιούν απορρυπαντικά κατά την έκπλυση της κεφαλής των ζώων.
16. Οι οφθαλμοί πρέπει να εμβαπτίζονται πλήρως σε διάλυμα αλάτων Hank (Hanks' Balanced Salt Solution/HBSS) εντός δοχείου κατάλληλου μεγέθους και να μεταφέρονται στο εργαστήριο κατά τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η υποβάθμιση ή/και η βακτηριδιακή μόλυνση. Επειδή οι οφθαλμοί συλλέγονται κατά τη διαδικασία σφαγής, ενδέχεται να εκτεθούν σε αίμα και σε άλλες βιολογικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριδίων και άλλων μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η ελαχιστοποίηση του κινδύνου μόλυνσης (π.χ. με τη φύλαξη του δοχείου που περιέχει τους οφθαλμούς σε υγρό πάγο, την προσθήκη αντιβιοτικών στο διάλυμα HBSS που χρησιμοποιείται για τη φύλαξη των οφθαλμών κατά τη μεταφορά [π.χ. 100 IU πενικιλίνης/mL και 100  $\mu\text{g}$  στρεπτομυκίνης/mL]).
17. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των οφθαλμών και της χρήσης των κερατοειδών στη μέθοδο δοκιμής BCOP πρέπει να είναι το μικρότερο δυνατόν (κατά κανόνα η συλλογή και η χρήση πρέπει να γίνονται την ίδια ημέρα) και να αποδεικνύεται ότι δεν υπονομεύει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα αυτά βασίζονται στα κριτήρια επιλογής των οφθαλμών, καθώς και στις αποκρίσεις των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων. Όλοι οι οφθαλμοί που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία πρέπει να προέρχονται από την ίδια ομάδα οφθαλμών που συλλέχθηκαν συγκεκριμένη ημέρα.

**Κριτήρια επιλογής των οφθαλμών που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο δοκιμής BCOP**

18. Μόλις οι οφθαλμοί φτάσουν στο εργαστήριο, εξετάζονται προσεκτικά για ελαττώματα όπως αυξημένη αδιαφάνεια, αμυχές και νεοαγγείωση. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο κερατοειδείς χωρίς ελαττώματα αυτού του είδους.
19. Η ποιότητα κάθε κερατοειδούς αξιολογείται και σε μεταγενέστερα στάδια της δοκιμασίας. Οι κερατοειδείς με αδιαφάνεια μεγαλύτερη των επτά μονάδων (ΣΗΜΕΙΩΣΗ: το αδιαφανόμετρο πρέπει να διακρίβώνεται βάσει των προτύπων αδιαφάνειας που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των μονάδων αδιαφάνειας, βλ. προσάρτημα 3) μετά από αρχική εξισορρόπηση διάρκειας μιας ώρας, πρέπει να απορρίπτονται.
20. Κάθε ομάδα οφθαλμών που υποβάλλεται σε αγωγή (ελεγχόμενη ουσία, παράλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες) αποτελείται από τουλάχιστον τρεις οφθαλμούς. Στη δοκιμασία BCOP, για τους αρνητικούς μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις κερατοειδείς. Δεδομένου ότι όλοι οι κερατοειδείς εκτέμνονται από τον πλήρη βολβό και στερεώνονται στους θαλάμους της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς, υπάρχει το ενδεχόμενο να εμφανιστούν τεχνητά σφάλματα (artefact) στις επιμέρους τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας του κερατοειδούς (συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα) λόγω του χειρισμού. Επιπλέον, οι τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας που λαμβάνονται από τους κερατοειδείς-αρνητικούς μάρτυρες χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των τιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του κερατοειδούς του δοκιμίου και των θετικών μαρτύρων στους υπολογισμούς της IVIS.

**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ****Προετοιμασία των οφθαλμών**

21. Κερατοειδείς χιτώνες χωρίς ελαττώματα ανατέμνονται κατά τρόπο ώστε να παραμένει δακτύλιος σκληρού χιτώνα 2 έως 3 mm με σκοπό τη διευκόλυνση του επακόλουθου χειρισμού, λαμβανομένης μέριμνας για την αποφυγή φθορών στο κερατοειδικό επιθήλιο και ενδοθήλιο. Οι απομονωθέντες κερατοειδείς στερεώνονται σε ειδικές διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς που αποτελούνται από εμπρόσθιο και οπίσθιο διαμέρισμα, τα οποία εφάπτονται με το επιθήλιο και το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, αντιστοίχως. Αμφότεροι οι θάλαμοι πληρώνονται μέχρι υπερχειλίσης με προθερμασμένο θρεπτικό υλικό ελάχιστων τροφικών απαιτήσεων Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium/EMEM) (πρώτα ο οπίσθιος θάλαμος), κατά τρόπο ώστε να μη σχηματίζονται φυσαλίδες. Η διάταξη αφήνεται εν συνεχεία να σταθεροποιηθεί στους  $32 \pm 1$  °C για τουλάχιστον μία ώρα ούτως ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία των κερατοειδών με τη θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού και να επιτευχθεί, στο μέτρο του δυνατού, φυσιολογική μεταβολική δραστηριότητα (η θερμοκρασία της επιφάνειας του κερατοειδούς *in vivo* είναι κατά προσέγγιση 32 °C).
22. Μετά την παρέλευση του διαστήματος εξισορρόπησης, προστίθεται φρέσκο προθερμασμένο EMEM σε αμφοτέρους τους θαλάμους και για κάθε κερατοειδή σημειώνονται οι αρχικές ενδείξεις αδιαφάνειας. Οι κερατοειδείς που εμφανίζουν μακροσκοπικές βλάβες ιστού (π.χ. αμυχές, χρώση, νεοαγγείωση) ή αδιαφάνεια > 7 μονάδων απορρίπτονται. Υπολογίζεται η μέση αδιαφάνεια όλων των εξισορροπημένων κερατοειδών. Τουλάχιστον τρεις κερατοειδείς με τιμές αδιαφάνειας που προσεγγίζουν τη διάμεση τιμή για όλους τους κερατοειδείς επιλέγονται ως αρνητικοί μάρτυρες (ή ως μάρτυρες με διαλυτή). Οι εναπομένοντες κερατοειδείς κατανέμονται στη συνέχεια σε ομάδες αγωγής ή θετικών μαρτύρων.
23. Επειδή η θερμοχωρητικότητα του νερού είναι υψηλότερη από του αέρα, το νερό παρέχει πιο σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας για επώαση. Κατά συνέπεια, για τη διατήρηση της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς και του περιεχομένου της σε θερμοκρασία  $32 \pm 1$  °C συνιστάται η χρήση υδατόλουτρου. Εντούτοις, μπορούν να χρησιμοποιούνται και επωαστήρες αέρα, με προφυλάξεις για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας (π.χ. με προθέρμανση των διατάξεων συγκράτησης και των θρεπτικών υλικών).

**Εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας**

24. Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πρωτόκολλα αγωγής, ένα για υγρά και επιφανειοδραστικά (στερεά ή υγρά) και ένα για μη επιφανειοδραστικά στερεά.
25. Τα υγρά υποβάλλονται σε δοκιμή χωρίς αραιώση, ενώ τα επιφανειοδραστικά υποβάλλονται σε δοκιμή σε συγκέντρωση 10 % w/v σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %, σε αποσταγμένο νερό ή σε άλλο διαλύτη για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής. Τα ημιστερεά, οι κρέμες και οι κηροί υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή ως υγρά. Για διαφορετικές αραιώσεις πρέπει να παρέχεται κατάλληλη αιτιολόγηση. Οι κερατοειδείς εκτίθενται στα υγρά και στα επιφανειοδραστικά επί 10 λεπτά. Σε περίπτωση διαφορετικής διάρκειας έκθεσης, πρέπει να παρέχεται κατάλληλη επιστημονική αιτιολόγηση.
26. Τα μη επιφανειοδραστικά στερεά υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή ως διαλύματα ή εναιωρήματα σε συγκέντρωση 20 % σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %, σε αποσταγμένο νερό ή σε άλλο διαλύτη για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής. Υπό ορισμένες συνθήκες και με την κατάλληλη επιστημονική αιτιολόγηση, τα στερεά μπορούν επίσης να υποβάλλονται σε δοκιμή ως έχουν, μέσω άμεσης εφαρμογής στην επιφάνεια του κερατοειδούς με τη μέθοδο του ανοικτού θαλάμου (βλ. παράγραφο 29). Οι κερατοειδείς εκτίθενται στα στερεά επί τέσσερις ώρες, αλλά, όπως και στην περίπτωση των υγρών και των επιφανειοδραστικών, μπορούν να χρησιμοποιούνται διαφορετικά διαστήματα έκθεσης κατόπιν κατάλληλης επιστημονικής αιτιολόγησης.
27. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι αγωγής, ανάλογα με τη φύση και τα χημικά χαρακτηριστικά της ελεγχόμενης ουσίας (π.χ. στερεά, υγρά, παχύρευστα έναντι μη παχύρευστων υγρών). Παράγοντας κρίσιμης σημασίας είναι να εξασφαλίζεται ότι η ελεγχόμενη ουσία καλύπτει επαρκώς την επιφάνεια του επιθηλίου και ότι απομακρύνεται κατά την έκπλυση. Η μέθοδος κλειστού θαλάμου χρησιμοποιείται κατά κανόνα για ελεγχόμενες ουσίες μη παχύρεστες έως ελαφρώς παχύρεστες, ενώ για τις ημι-παχύρεστες και παχύρεστες, καθώς και για τα στερεά ως έχουν χρησιμοποιείται κατά κανόνα μέθοδος ανοικτού θαλάμου.

28. Στη μέθοδο κλειστού θαλάμου, ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας (750 µL) που επαρκεί ώστε να καλύπτεται το επιθήλιο του κερατοειδούς, εισάγεται στον εμπρόσθιο θάλαμο μέσω των δοσιμετρικών οπών στην επάνω επιφάνειά του και, εν συνεχεία, οι οπές σφραγίζονται κατά την έκθεση με τα πώματα του θαλάμου. Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η έκθεση κάθε κερατοειδούς στην ελεγχόμενη ουσία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα.
29. Στη μέθοδο ανοικτού θαλάμου, πριν από την αγωγή αφαιρούνται από τον εμπρόσθιο θάλαμο ο δακτύλιος ασφάλισης της θυρίδας και η γυάλινη θυρίδα. Ο μάρτυρας ή η ελεγχόμενη ουσία (750 µL ή ποσότητα που επαρκεί για την πλήρη κάλυψη του κερατοειδούς) εφαρμόζεται απευθείας στην επιφάνεια του επιθηλίου του κερατοειδούς με τη βοήθεια μικροσιφονίου. Εάν είναι δύσκολη η αναρρόφηση μιας ελεγχόμενης ουσίας, η ουσία μπορεί να φέρεται υπό πίεση σε σιφώνιο θετικής μετατόπισης για τη διευκόλυνση της δοσιμέτρησης. Το ρύγχος του σιφονίου θετικής μετατόπισης εισάγεται στο άκρο έκχυσης της σύριγγας κατά τρόπο ώστε το υλικό να φέρεται υπό πίεση στο ρύγχος μετατόπισης. Ταυτοχρόνως, πιέζεται το έμβολο της σύριγγας ενόσω το έμβολο του σιφονίου έλκεται προς τα επάνω. Εάν εμφανιστούν φυσαλίδες αέρα στο ρύγχος του σιφονίου, το δοκίμιο απομακρύνεται (εξωθείται) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου το ρύγχος πληρωθεί χωρίς να σχηματίζονται φυσαλίδες αέρα. Εάν χρειαστεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κανονική σύριγγα (χωρίς βελόνα), η οποία επιτρέπει τη μέτρηση επακριβούς όγκου ελεγχόμενης ουσίας και την ευκολότερη εφαρμογή στο επιθήλιο του κερατοειδούς. Μετά τη δοσιμέτρηση, η γυάλινη θυρίδα επανανοθετείται στον εμπρόσθιο θάλαμο για να δημιουργηθεί εκ νέου κλειστό σύστημα.

#### Επώαση μετά την έκθεση

30. Μετά την παρέλευση του διαστήματος έκθεσης, η ελεγχόμενη ουσία, ο αρνητικός μάρτυρας ή ο θετικός μάρτυρας απομακρύνεται από τον εμπρόσθιο θάλαμο και το επιθήλιο υποβάλλεται σε έκπλυση τουλάχιστον τρεις φορές (ή έως ότου δεν παρατηρούνται οπτικές ενδείξεις της ελεγχόμενης ουσίας) με EMEM (που περιέχει ερυθρό της φαινόλης). Για την έκπλυση χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό που περιέχει ερυθρό της φαινόλης διότι με την παρακολούθηση της αλλαγής του χρώματος του ερυθρού της φαινόλης είναι εφικτός ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας της έκπλυσης όξινων ή αλκαλικών υλικών. Οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε έκπλυση περισσότερες από τρεις φορές, εάν το ερυθρό της φαινόλης εξακολουθεί να αποχρωματίζεται (κίτρινο ή μοβ) ή εάν παραμένει ορατή η ελεγχόμενη ουσία. Όταν η ελεγχόμενη ουσία απομακρυνθεί πλήρως από το μέσο, οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε τελική έκπλυση με EMEM (χωρίς ερυθρό της φαινόλης). Το EMEM (χωρίς ερυθρό της φαινόλης) χρησιμοποιείται ως διάλυμα τελικής έκπλυσης ούτως ώστε να διασφαλίζεται η απομάκρυνση του ερυθρού της φαινόλης από τον εμπρόσθιο θάλαμο πριν από τη μέτρηση της αδιαφάνειας. Στη συνέχεια, ο εμπρόσθιος θάλαμος πληρώνεται εκ νέου με φρέσκο EMEM που δεν περιέχει ερυθρό της φαινόλης.
31. Όσον αφορά τα υγρά ή τα επιφανειοδραστικά, μετά την έκπλυσή τους οι κερατοειδείς υποβάλλονται σε επώαση για δύο επιπλέον ώρες στους  $32 \pm 1$  °C. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι σκόπιμη η παράταση της διάρκειας επώασης μετά την έκθεση, κάτι το οποίο κρίνεται κατά περίπτωση. Οι κερατοειδείς που υποβάλλονται σε αγωγή με στερεά εκπλύνονται σχολαστικά στο τέλος του τετράωρου διαστήματος έκθεσης, αλλά δεν απαιτείται περαιτέρω επώαση.
32. Στο τέλος του διαστήματος επώασης μετά την έκθεση σε υγρά και επιφανειοδραστικά και στο τέλος του τετράωρου διαστήματος έκθεσης σε μη επιφανειοδραστικά στερεά, καταγράφεται η αδιαφάνεια και η διαπερατότητα κάθε κερατοειδούς. Επίσης, κάθε κερατοειδής επιθεωρείται οπτικά και καταγράφονται οι σχετικές παρατηρήσεις (π.χ. αποφλοίωση ιστού, κατάλοιπα ελεγχόμενης ουσίας, ανομοιογενής αδιαφάνεια). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι πιθανότατα σημαντικές καθώς ενδέχεται να αντικατοπτρίζονται στις διακυμάνσεις των ενδείξεων του αδιαφανομέτρου.

#### Ουσίες-μάρτυρες

33. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται παράλληλοι αρνητικοί μάρτυρες ή μάρτυρες με διαλύτη/φορέα και θετικοί μάρτυρες.
34. Κατά τη δοκιμή υγρής ουσίας χωρίς αραίωση, στη μέθοδο δοκιμών BCOP περιλαμβάνεται παράλληλος αρνητικός μάρτυρας (π.χ. χλωριούχο νάτριο 0,9 % ή αποσταγμένο νερό), ούτως ώστε να ανχνεύονται μη ειδικές αλλαγές στο σύστημα δοκιμής και να παρέχεται μια αρχική τιμή για τα τελικά σημεία της δοκιμής. Κατά τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται επίσης ότι οι συνθήκες της δοκιμής δεν προκαλούν πλασματική απόκριση ερεθισμού.
35. Κατά τη δοκιμή αραιωμένου υγρού, επιφανειοδραστικού ή στερεού, στη μέθοδο δοκιμών BCOP περιλαμβάνεται ομάδα παράλληλου μάρτυρα με διαλύτη/φορέα, ούτως ώστε να ανχνεύονται μη ειδικές αλλαγές στο σύστημα δοκιμής και να παρέχεται μια αρχική τιμή για τα τελικά σημεία της δοκιμασίας. Μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο διαλύτης/φορέας για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής.
36. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται γνωστό ερεθιστικό οφθαλμών ως παράλληλος θετικός μάρτυρας, ούτως ώστε να εξακριβώνεται η πρόκληση της κατάλληλης απόκρισης. Δεδομένου ότι στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η δοκιμασία BCOP χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών ή ισχυρών ερεθιστικών, ο θετικός μάρτυρας πρέπει υπό ιδανικές συνθήκες να είναι ουσία αναφοράς που προκαλεί ισχυρή απόκριση στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμών. Προκειμένου, ωστόσο, να διασφαλιστεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της απόκρισης ερεθισμού δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.
37. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων για τις υγρές ελεγχόμενες ουσίες είναι το διμεθυλοφορμαμίδιο ή το υδροξείδιο του νατρίου 1 %. Παράδειγμα θετικού μάρτυρα για τις στερεές ελεγχόμενες ουσίες είναι το ιμιδαζόλιο 20 % (κατά βάρος προς όγκο) σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9 %.

38. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν σημείο αναφοράς είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού ερεθιστικού δυναμικού ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου εύρους αποκρίσεων ερεθισμού.

#### Μετρούμενα τελικά σημεία

39. Η αδιαφάνεια προσδιορίζεται από την ποσότητα φωτός που μεταδίδεται μέσω του κερατοειδούς. Η αδιαφάνεια του κερατοειδούς μετράται ποσοτικά με τη χρήση αδιαφανομέτρου, με το οποίο λαμβάνονται τιμές αδιαφάνειας μετρούμενες σε συνεχή κλίμακα.
40. Η διαπερατότητα προσδιορίζεται από την ποσότητα χρωστικής νατριούχου φλουορεσκεΐνης που διαπερνά όλες τις κυτταρικές στιβάδες του κερατοειδούς (δηλ. το επιθήλιο στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς έως το ενδοθήλιο στην εσωτερική επιφάνειά του). Στον εμπρόσθιο θάλαμο της διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς, ο οποίος βρίσκεται σε επαφή με το επιθήλιο του κερατοειδούς, προστίθεται 1 mL διαλύματος νατριούχου φλουορεσκεΐνης (4 ή 5 mg/mL κατά τη δοκιμή υγρών και επιφανειοδραστικών ή μη επιφανειοδραστικών στερεών, αντιστοίχως), ενώ ο οπίσθιος θάλαμος, που βρίσκεται σε επαφή με το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, πληρώνεται με φρέσκο EMEM. Η διάταξη συγκράτησης επώαζεται εν συνεχεία σε οριζόντια θέση επί 90 ± 5 min σε θερμοκρασία 32 ± 1 °C. Η ποσότητα νατριούχου φλουορεσκεΐνης που εισέρχεται στον οπίσθιο θάλαμο μετράται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία ορατού/υπεριώδους. Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις που λαμβάνονται στα 490 nm καταγράφονται ως τιμές οπτικής πυκνότητας (OD<sub>490</sub>) ή απορρόφησης, μετρούμενες σε συνεχή κλίμακα. Οι τιμές διαπερατότητας για τη φλουορεσκεΐνη προσδιορίζονται βάσει των τιμών OD<sub>490</sub> που λαμβάνονται με φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός με πρότυπο μήκος διαδρομής 1 cm.
41. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης 96 κοιλότητων εφόσον (i) μπορεί να καθοριστεί το γραμμικό εύρος της συσκευής ανάγνωσης πλακών για τον προσδιορισμό των τιμών OD<sub>490</sub> για τη φλουορεσκεΐνη και (ii) χρησιμοποιείται ο ορθός όγκος δειγμάτων φλουορεσκεΐνης στην πλάκα 96 κοιλότητων για την επίτευξη τιμών OD<sub>490</sub> ισοδύναμων με το πρότυπο μήκος διαδρομής 1 cm (αυτό απαιτεί ενδεχομένως εντελώς πλήρεις κοιλότητες [συνήθως 360L]).

#### ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

##### Αξιολόγηση των δεδομένων

42. Μετά τη διόρθωση των τιμών αδιαφάνειας και μέσης διαπερατότητας (OD<sub>490</sub>) για να ληφθούν υπόψη η αδιαφάνεια υποβάθρου και οι τιμές διαπερατότητας OD<sub>490</sub> που αντιστοιχούν στον αρνητικό μάρτυρα, οι μέσες τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας OD<sub>490</sub> για κάθε ομάδα αγωγής πρέπει να συνδυάζονται σε εμπειρικό τύπο για τον υπολογισμό της βαθμολογίας ερεθιστικότητας *in vitro* (IVIS) για κάθε ομάδα αγωγής, ως εξής:

$$IVIS = \text{μέση τιμή αδιαφάνειας} + (15 \times \text{μέση τιμή διαπερατότητας OD}_{490})$$

Οι Sina *et al.* (16) αναφέρουν ότι ο συγκεκριμένος τύπος προέκυψε στο πλαίσιο ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών. Τα δεδομένα που προέκυψαν για μια σειρά 36 ενώσεων στο πλαίσιο πολυεργαστηριακής μελέτης υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση για τον καθορισμό της εξίσωσης βέλτιστης προσαρμογής δεδομένων *in vivo* και *in vitro*. Η ανάλυση αυτή διεξήχθη από επιστήμονες σε δύο διαφορετικές εταιρείες, οι οποίοι κατέληξαν σε σχεδόν πανομοιότυπες εξισώσεις.

43. Οι τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας πρέπει επίσης να αξιολογούνται χωριστά, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν μια ελεγχόμενη ουσία προκαλεί διαβρωτικότητα ή σοβαρό ερεθισμό μέσω ενός μόνο από τα δύο τελικά σημεία (βλ. κριτήρια απόφασης).

##### Κριτήρια απόφασης

44. Μια ουσία που συνεπάγεται IVIS ≥ 55,1 ορίζεται ως διαβρωτική ή ισχυρά ερεθιστική. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1, εάν η ελεγχόμενη ουσία δεν χαρακτηρίζεται ως διαβρωτική ή ισχυρά ερεθιστική για τους οφθαλμούς, πρέπει να διεξάγονται επιπρόσθετες δοκιμές για ταξινόμηση και επισήμανση. Η μέθοδος δοκιμών BCOP έχει συνολική ακρίβεια 79 % (113/143) έως 81 % (119/147), ψευδοθετικό ποσοστό 19 % (20/103) έως 21 % (22/103) και ψευδοαρνητικό ποσοστό 16 % (7/43) έως 25 % (10/40), σε σύγκριση με τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μέθοδο οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια, τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης της EPA (1), της ΕΕ (2) ή GHS (3). Όταν αποκλείονται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες ορισμένων κατηγοριών, χημικών (αλκοόλες, κετόνες) και φυσικών (στερεά), η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμής BCOP στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της EPA και GHS κυμαίνεται από 87 % (72/83) έως 92 % (78/85), ενώ τα ψευδοθετικά ποσοστά κυμαίνονται από 12 % (7/58) έως 16 % (9/56) και τα ψευδοαρνητικά από 0 % (0/27) έως 12 % (3/26).
45. Ακόμη και εάν μια ελεγχόμενη ουσία δεν ταξινομηθεί ως διαβρωτική ή ισχυρά ερεθιστική για τους οφθαλμούς, τα δεδομένα της μεθόδου δοκιμής BCOP μπορούν να χρησιμεύσουν, σε συνδυασμό με δεδομένα από την οφθαλμική δοκιμή *in vivo* σε κουνέλια ή από επαρκώς επικυρωμένη δοκιμή *in vitro*, για την περαιτέρω αξιολόγηση της σκοπιμότητας και των περιορισμών της μεθόδου δοκιμών BCOP ως προς τον χαρακτηρισμό μη ισχυρών ερεθιστικών και μη ερεθιστικών (καταρτίζεται έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χρήση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro*).

**Κριτήρια αποδοχής της μελέτης**

46. Μια δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν για τον θετικό μάρτυρα προκύπτει IVIS που εμπίπτει εντός δύο τυπικών αποκλίσεων της ισχύουσας ιστορικής μέσης τιμής, η οποία πρέπει να επικαιροποιείται τουλάχιστον ανά τρίμηνο ή κάθε φορά που εκτελείται αποδεκτή δοκιμή σε εργαστήρια όπου δεν διεξάγονται συχνά δοκιμές (λιγότερο από μία φορά το μήνα). Οι αποκρίσεις στον αρνητικό μάρτυρα ή στον μάρτυρα με διαλύτη/φορέα πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα τιμές αδιαφάνειας και διαπερατότητας μικρότερες από τα καθορισμένα ανώτερα όρια των τιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας υποβάθρου για κερατοειδείς βοοειδών που υποβάλλονται σε αγωγή με τον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα ή μάρτυρα με διαλύτη/φορέα.

**Έκθεση δοκιμής**

47. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης:

*Ελεγχόμενες ουσίες και μάρτυρες*

χημική(ές) ονομασία(ες) όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη(ες) από άλλες ονομασίες, εφόσον είναι γνωστές

αριθμός μητρώου CAS (RN), εάν είναι γνωστός

καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του μείγματος (σε εκατοστιαία αναλογία κατά βάρος), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα

φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η φυσική κατάσταση, η πιητικότητα, το pH, η σταθερότητα, η χημική κατηγορία, η υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης

τυχόν επεξεργασία των ελεγχόμενων ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή (π.χ. θέρμανση, κονιοποίηση)

σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή.

*Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών*

όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης

προέλευση των οφθαλμών (εγκατάσταση από την οποία συλλέχθηκαν)

συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς των οφθαλμών (π.χ. ημερομηνία και χρόνος συλλογής των οφθαλμών, χρονικό διάστημα πριν από την έναρξη της δοκιμής, μέσα μεταφοράς, συνθήκες θερμοκρασίας και τα τυχόν χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά)

εάν είναι διαθέσιμα, τα ειδικά χαρακτηριστικά των ζώων από τα οποία συλλέχθηκαν οι οφθαλμοί (π.χ. ηλικία, φύλο, βάρος του ζώου δότη).

*Αιτιολόγηση της μεθόδου και του πρωτοκόλλου δοκιμής που χρησιμοποιούνται**Ακεραιότητα της μεθόδου δοκιμών*

διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της ακεραιότητας (ορθότητα και αξιοπιστία) της μεθόδου δοκιμών με την πάροδο του χρόνου (π.χ. περιοδικές δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας, χρήση ιστορικών δεδομένων για τους αρνητικούς και τους θετικούς μάρτυρες).

*Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής*

αποδεκτά πεδία τιμών για τους παράλληλους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες βάσει ιστορικών δεδομένων

εάν υπάρχει, το αποδεκτό εύρος τιμών για τους παράλληλους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης βάσει ιστορικών δεδομένων.

*Συνθήκες δοκιμής*

περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής

τύπος της χρησιμοποιούμενης διάταξης συγκράτησης κερατοειδούς

πληροφορίες σχετικά με τη διακρίβωση των συσκευών που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της αδιαφάνειας και της διαπερατότητας (π.χ. αδιαφανόμετρο και φασματοφωτόμετρο)

πληροφορίες σχετικά με τους χρησιμοποιούμενους κερατοειδείς βροειδών, συμπεριλαμβανομένων δηλώσεων σχετικά με την ποιότητά τους

λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής

χρησιμοποιούμενη(ες) συγκέντρωση(εις) της ελεγχόμενης ουσίας

περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής

παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα του μοντέλου (π.χ. αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, ουσίες ελέγχου ικανότητας, ουσίες συγκριτικής αξιολόγησης)

περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης.

#### Αποτελέσματα

παρουσίαση σε πίνακα των δεδομένων από μεμονωμένα δείγματα δοκιμής (π.χ. τιμές αδιαφάνειας και OD<sub>490</sub> και βαθμολογία IVIS για την ελεγχόμενη ουσία δοκιμής, για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και για τους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης [εφόσον έχουν συμπεριληφθεί], σε μορφή πίνακα, καθώς και δεδομένων από πολλαπλά επαναλαμβανόμενα πειράματα ανάλογα με την περίπτωση, και μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση για κάθε πείραμα)

περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων.

#### Συζήτηση των αποτελεσμάτων

#### Συμπέρασμα

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006. ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html\]](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)
- (4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](http://ecvam.jrc.it/index.htm)
- (5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). Αρ. δημοσίευσης NIH: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmer.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm)
- (6) ΕΚ (2006). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ. ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[\[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html\]](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)



- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). Αρ. δημοσίευσης NIH: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:
- [[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: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:
- [[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) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:
- [<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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:
- [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

---

#### Προσάρτημα 1

#### ΟΡΙΣΜΟΙ

**Ακρίβεια:** η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μία από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται εναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

**Ουσία που χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς:** ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία που χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: (i) σταθερή(ές) και αξιόπιστη(ες) πηγή(ές), (ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς την κατηγορία των ελεγχόμενων ουσιών, (iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, (iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

**Κερατοειδής:** το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του οφθαλμού.

**Αδιαφάνεια κερατοειδούς:** μέτρηση του βαθμού θολρότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία. Η αυξημένη αδιαφάνεια είναι ενδεικτική βλάβης του κερατοειδούς. Η αδιαφάνεια αξιολογείται υποκειμενικά, όπως στην οφθαλμική δοκιμή Draize σε κουνέλια, ή αντικειμενικά με όργανο όπως το «αδιαφανόμετρο».

**Διαπερατότητα κερατοειδούς:** ποσοτική μέτρηση της βλάβης στο επιθήλιο του κερατοειδούς μέσω προσδιορισμού της ποσότητας χρωστικής νατριούχου φλουορεσκείνης που διέρχεται διαμέσου όλων των κυτταρικών στιβάδων του κερατοειδούς.

**Κατηγορία EPA 1:** διάβρωση (μη αναστρέψιμη καταστροφή οφθαλμικού ιστού) ή προσβολή ή ερεθισμός του κερατοειδούς που εμμένει για περισσότερες από 21 ημέρες (1).

**Κατηγορία EE R41:** βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (2).

**Ψευδοαρνητικό ποσοστό:** το ποσοστό όλων των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

**Ψευδοθετικό ποσοστό:** το ποσοστό όλων των αρνητικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

**GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals/Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα για την Ταξινόμηση και Επισήμανση των Χημικών Προϊόντων):** σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένες κατηγορίες ταξινόμησης και κλίμακες φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις κινδύνου, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (3).

**Κατηγορία GHS 1:** βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής της ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (3).

**Επικινδυνότητα:** εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπο)πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

**Βαθμολογία ερεθιστικότητας *in vitro* (In Vitro Irritancy Score/IVIS):** εμπειρικός τύπος που χρησιμοποιείται στη μέθοδο δοκιμών BCOP και στον οποίο η μέση αδιαφάνεια και η μέση διαπερατότητα για κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή συνδυάζονται σε ενιαία βαθμολογία *in vitro* για κάθε ομάδα που υποβάλλεται σε αγωγή. IVIS = μέση τιμή αδιαφάνειας + (15 x μέση τιμή διαπερατότητας).

**Αρνητικός μάρτυρας:** δείγμα-αντίγραφο- που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

**Μη ερεθιστικά:** ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA I, II, ή III, ούτε κατηγορίας EE R41 ή R36, ούτε κατηγορίας GHS 1, 2A ή 2B.

**Διαβρωτικό των οφθαλμών:** α) ουσία που προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, β) ουσία που ταξινομείται ως διαβρωτική για τους οφθαλμούς κατηγορίας GHS 1, EPA I ή EE R41 (1) (2) (3).

**Ερεθιστικό των οφθαλμών:** α) ουσία που προκαλεί αναστρέψιμη αλλαγή στους οφθαλμούς κατόπιν εφαρμογής στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA II ή III, EE R36 ή GHS 2A ή 2B (1) (2) (3).

**Ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών:** α) ουσία που προκαλεί βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, κατόπιν εφαρμογής στην πρόσδια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν υποχωρεί εντός 21 ημερών από την εφαρμογή, ή που προκαλεί σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς κατηγορίας GHS 1, EPA 1 ή EE R41 (1) (2) (3).

**Αδιαφανόμετρο:** όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της «αδιαφάνειας του κερατοειδούς» μέσω ποσοτικής αξιολόγησης της ποσότητας του φωτός που διέρχεται από τον κερατοειδή. Το σύνθηδες όργανο περιλαμβάνει δύο διαμερίσματα, το καθένα από τα οποία διαθέτει δική του φωτεινή πηγή και φωτοκύτταρο. Το ένα διαμέρισμα χρησιμοποιείται για τον κερατοειδή που έχει υποβληθεί σε αγωγή, ενώ το άλλο χρησιμοποιείται για τη διακρίβωση και τον μηδενισμό των ενδείξεων του οργάνου. Το φως από έναν λαμπτήρα αλογόνου διοχετεύεται μέσω διαμερίσματος-μάρτυρα (κενός θάλαμος χωρίς θυρίδες ούτε υγρό) σε φωτοκύτταρο και συγκρίνεται με το φως που διοχετεύεται σε φωτοκύτταρο μέσω του πειραματικού διαμερίσματος, το οποίο περικλείει τον θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή. Συγκρίνεται η διαφορά στη μετάδοση του φωτός από τα φωτοκύτταρα και εμφανίζεται σε ψηφιακή οθόνη μια αριθμητική τιμή αδιαφάνειας.

**Θετικός μάρτυρας:** δείγμα-πανομοίωτο που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.

**Αξιοπιστία:** μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαραχθεί ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά με την πάροδο του χρόνου όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Αξιολογείται μέσω του υπολογισμού της ενδο- και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

**Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα:** δείγμα που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα, και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα της ελεγχόμενης ουσίας που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον προσδιορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, υποδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

**Κλιμακωτή δοκιμή:** στρατηγική δοκιμών κατά στάδια στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια ελεγχόμενη ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της μαρτυρίας σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν για μια απόφαση ταξινόμησης κινδύνου διατίθενται επαρκείς πληροφορίες. Εάν σε ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε ελεγχόμενη ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών ελέγχων σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

**Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών:** μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ορθότητα και η αξιοπιστία μιας επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών ενδέχεται να μην επαρκούν για την αποδοχή της για τον προτεινόμενο σκοπό.

**Βάρος της απόδειξης:** η διαδικασία εξέτασης των πλεονεκτημάτων και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με την επικινδυνότητα μιας ουσίας.

## Προσάρτημα 2

### Ουσίες ελέγχου ικανότητας για τη μέθοδο δοκιμών BCOP

Πριν από την ένταξη μιας μεθόδου που συμφωνεί με την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην καθημερινή πρακτική, τα εργαστήρια ενδέχεται να επιθυμούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας ορθά την ταξινόμηση της διαβρωτικότητας των 10 συνιστώμενων στον πίνακα 1 ουσιών για τους οφθαλμούς. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων για τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση των οφθαλμών, το οποίο βασίζεται στα αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (TG 405) (κατηγορίες 1, 2A, 2B ή χωρίς ταξινόμηση και επισήμανση σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3) (7)). Λαμβανομένης, ωστόσο, υπόψη της επικυρωμένης σκοπιμότητας των δοκιμασιών αυτών (δηλ. μόνο για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), η ικανότητα αποδεικνύεται μόνο με δύο αποτελέσματα δοκιμών για ταξινόμηση (διαβρωτικό/ισχυρό ερεθιστικό ή μη διαβρωτικό/μη ισχυρό ερεθιστικό). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς *in vivo*, καθώς και δεδομένων υψηλής ποιότητας από τις δύο μεθόδους *in vitro* για τις οποίες καταρτίζονται κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών. Για τον λόγο αυτό, οι ερεθιστικές ουσίες επιλέχθηκαν από τον συνιστώμενο από την ICCVAM κατάλογο 122 ουσιών αναφοράς για την επικύρωση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro* (βλ. Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances/Προσάρτημα H: Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς της ICCVAM) (5). Τα δεδομένα αναφοράς διατίθενται στα Background Review Documents (έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων) της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών BCOP και τη μέθοδο δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων (ICE) (17) (18).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας ως προς τη δοκιμή BCOP

Χημική ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση <i>In Vivo</i> (2)	Ταξινόμηση <i>In Vitro</i> (3)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (5%)	8001-54-5	Κατιονική ένωση	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Χλωρεξιδίνη	55-56-1	Αμίνη, αμιδίνη	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
L-τρυγικό διβενζούλιο	2743-38-6	Εστέρας καρβοξυλικού οξέος	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Ιμιδαζόλιο	288-32-4	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Τριγλωροξικό οξύ (30%)	76-03-9	Καρβοξυλικό οξύ	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
2,6-διγλωροβενζοϊλοχλωρίδιο	4659-45-4	Ακυλαλογονίδιο	Υγρό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
2-μεθυλακετοξικό αιθύλιο	609-14-3	Κετονεστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2B	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Γλυκερίνη	56-81-5	Αλκοόλη	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
n-εξάνιο	110-54-3	Υδρογονάνθρακας (άκυκλος)	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

Συντμήσεις: CASRN = Αριθμός Μητρώου της Chemical Abstracts Service

(1) Κάθε ελεγχόμενη ουσία δοκιμής κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με τυποποιημένο σύστημα ταξινόμησης, βάσει του συστήματος ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στον δικτυακό τόπο <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).(2) Βάσει των αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (OECD TG 405) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3)(7).

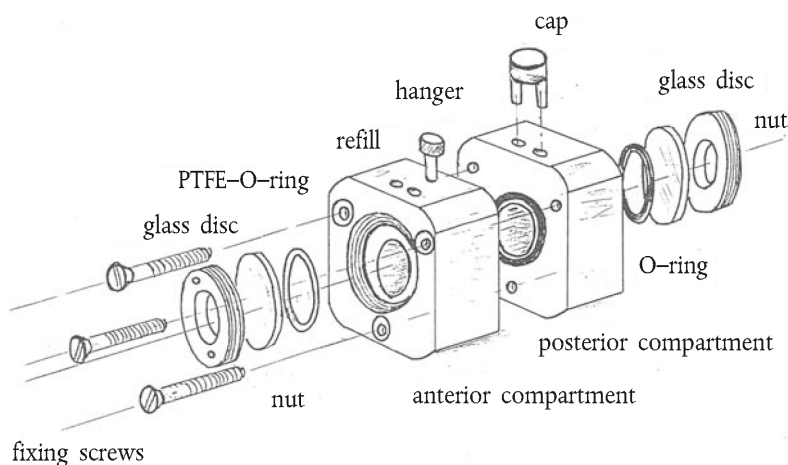
(3) Βάσει των αποτελεσμάτων των μεθόδων δοκιμών BCOP και ICE.

## Προσάρτημα 3

## ΔΙΑΤΑΞΗ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ BCOP

1. Οι διατάξεις συγκράτησης κερατοειδούς στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών BCOP κατασκευάζονται από αδρανές υλικό (π.χ. πολυπροπυλένιο). Οι διατάξεις αποτελούνται από δύο ημίσεια (εμπρόσθιο και οπίσθιο θάλαμο) και έχουν δύο παρόμοιους εσωτερικούς κυλινδρικούς θαλάμους. Κάθε θάλαμος έχει χωρητικότητα 5 mL και καταλήγει σε γυάλινη θυρίδα, μέσω της οποίας καταγράφονται οι μετρήσεις αδιαφάνειας. Καθένας από τους εσωτερικούς θαλάμους έχει διάμετρο 1,7 cm και βάθος 2,2 cm (1). Για την αποφυγή διαρροών χρησιμοποιείται στεγανοποιητικός δακτύλιος που βρίσκεται στον οπίσθιο θάλαμο. Ο κερατοειδής τοποθετείται με την πλευρά του ενδοθηλίου προς τα κάτω, επάνω στον στεγανοποιητικό δακτύλιο του οπίσθιου θαλάμου και ο εμπρόσθιος θάλαμος τοποθετείται στην πλευρά του επιθηλίου του κερατοειδούς. Οι θάλαμοι συγκρατούνται στη θέση τους με τρεις ανοξειδωτους χαλύβδινους κοχλίες που βρίσκονται στα εξωτερικά άκρα κάθε θαλάμου. Κάθε θάλαμος καταλήγει σε γυάλινη θυρίδα που μπορεί να αποσπάται για εύκολη πρόσβαση στον κερατοειδή. Μεταξύ της γυάλινης θυρίδας και του θαλάμου παρεμβάλλεται επίσης στεγανοποιητικός δακτύλιος για την αποφυγή διαρροών. Δύο οπές στο άνω τμήμα κάθε θαλάμου καθιστούν εφικτή την προσθήκη και αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ενώσεων δοκιμής. Οι οπές αυτές κλείνουν κατά τη διάρκεια της αγωγής και της επώασης με πώματα από καουτσούκ.

(1) Οι αναφερόμενες διαστάσεις βασίζονται σε διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς που χρησιμοποιείται για αγελάδες ηλικίας 12 έως 60 μηνών. Εάν χρησιμοποιούνται ζώα ηλικίας 6 έως 12 μηνών, η διάταξη συγκράτησης πρέπει να είναι σχεδιασμένη κατά τρόπο ώστε κάθε θάλαμος να έχει χωρητικότητα 4 mL και κάθε εσωτερικός θάλαμος να έχει διάμετρο 1,5 cm και βάθος 2,2 cm. Σε κάθε διάταξη συγκράτησης νέας κατασκευής είναι πολύ σημαντικό η αναλογία της εκτεθειμένης επιφάνειας κερατοειδούς προς τη χωρητικότητα του οπίσθιου θαλάμου να είναι η ίδια όπως στη συμβατική διάταξη συγκράτησης κερατοειδούς. Αυτό είναι απαραίτητο ούτως ώστε να διασφαλίζεται ο ορθός προσδιορισμός των τιμών διαπερατότητας για τον υπολογισμό της IVIS με τη βοήθεια του προτεινόμενου τύπου.



#### Υπόμνημα

Glass disc: Γυάλινος δίσκος

PTFE-O-ring: Στεγανοποιητικός δακτύλιος από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)

Refill: Αναπλήρωση

Hanger: Αναρτήρας

Cap: Πώμα

Nut: Περικόχλιο

O-ring: Στεγανοποιητικός δακτύλιος

Posterior compartment: Οπίσθιο διαμέρισμα

Anterior compartment: Εμπρόσθιο διαμέρισμα

Fixing screws: Κοχλίες στερέωσης

#### ΤΟ ΑΔΙΑΦΑΝΟΜΕΤΡΟ

2. Το αδιαφανόμετρο είναι διάταξη μέτρησης της μετάδοσης του φωτός. Το φως από έναν λαμπτήρα αλογόνου διοχετεύεται μέσω διαμερίσματος-μάρτυρα (κενός θάλαμος χωρίς θυρίδες ούτε υγρό) σε φωτοκύτταρο και συγκρίνεται με το φως που διοχετεύεται σε φωτοκύτταρο μέσω του πειραματικού διαμερίσματος το οποίο περικλείει τον θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή. Συγκρίνεται η διαφορά στη μετάδοση του φωτός από τα φωτοκύτταρα και εμφανίζεται σε ψηφιακή οθόνη μια αριθμητική τιμή αδιαφάνειας, εκφραζόμενη σε μονάδες αδιαφάνειας.
3. Το αδιαφανόμετρο πρέπει να παρέχει γραμμική απόκριση σε ένα εύρος ενδείξεων αδιαφάνειας το οποίο καλύπτει τις τιμές διαχωρισμού (cut-off) που χρησιμοποιούνται για τις διάφορες ταξινομήσεις που περιγράφονται στο μοντέλο πρόβλεψης (έως και την τιμή διαχωρισμού που καθορίζει τη διαβρωτικότητα/ισχυρή ερεθιστικότητα). Για να διασφαλίζονται η γραμμικότητα και η ορθότητα των ενδείξεων έως και τις 75-80 μονάδες αδιαφάνειας, είναι απαραίτητη η διακρίβωση του αδιαφανόμετρου με σειρά βαθμονομητών. Οι βαθμονομητές (αδιαφανή πολυεστερικά φύλλα) τοποθετούνται στον θάλαμο διακρίβωσης (θάλαμος της διάταξης συγκράτησης του κερατοειδούς όπου τοποθετούνται οι βαθμονομητές) και παρέχουν ενδείξεις που εμφανίζονται στο αδιαφανόμετρο. Ο θάλαμος διακρίβωσης είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε να συγκρατεί τους βαθμονομητές στην ίδια περίπου απόσταση μεταξύ του λαμπτήρα και του φωτοκυττάρου στην οποία τοποθετούνται οι κερατοειδείς κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αδιαφάνειας. Το αδιαφανόμετρο διακρίβώνεται αρχικά στις 0 μονάδες αδιαφάνειας χωρίς βαθμονομητή στον θάλαμο διακρίβωσης. Εν συνεχεία, στον θάλαμο διακρίβωσης τοποθετούνται διαδοχικά τρεις βαθμονομητές και μετρώνται οι τιμές αδιαφάνειας. Από τους βαθμονομητές 1, 2 και 3 πρέπει να προκύπτουν ενδείξεις αδιαφάνειας ίσες με τις καθορισμένες τιμές 75, 150 και 225 μονάδων αδιαφάνειας, αντιστοίχως, με απόκλιση  $\pm 5\%$ .

**B. 48 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥΣ ΟΦΘΑΛΜΟΥΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΩΝ ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1. Η μέθοδος δοκιμών σε απομονωμένους οφθαλμούς ορνιθίων (Isolated Chicken Eye/ICE) αποτελεί μέθοδο δοκιμών *in vitro* που μπορεί να χρησιμοποιείται, υπό συγκεκριμένες περιστάσεις και περιορισμούς, για την ταξινόμηση ουσιών και μειγμάτων ως διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών (1) (2) (3). Για τους σκοπούς της παρούσας κατευθυντήριας γραμμής δοκιμής, ως ισχυρά ερεθιστικά ορίζονται εκείνα που προκαλούν οφθαλμικές αλλοιώσεις που εμμένουν στο κουνέλι για τουλάχιστον 21 ημέρες μετά τη χορήγηση. Αν και δεν θεωρείται έγκυρη για την πλήρη αντικατάσταση της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια, η μέθοδος ICE συνιστάται για χρήση στο πλαίσιο στρατηγικής κλιμακωτών δοκιμών για ρυθμιστική ταξινόμηση και επισήμανση εντός συγκεκριμένου πεδίου εφαρμογής (4) (5). Οι ελεγχόμενες ουσίες και μείγματα (6) που εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα στην παρούσα δοκιμασία μπορούν να ταξινομηθούν ως διαβρωτικά ή ισχυρά ερεθιστικά των οφθαλμών χωρίς περαιτέρω δοκιμές σε κουνέλια. Ουσίες που εμφανίζουν αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή σε κουνέλια στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων, όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή 405 (7) του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (κεφάλαιο B. 5 του παρόντος παραρτήματος).
2. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της πιθανής διαβρωτικότητας ή ισχυρής ερεθιστικότητας μιας ελεγχόμενης ουσίας για τους οφθαλμούς, όπως μετράται από την ικανότητά της να προκαλεί τοξικότητα σε εξορυγμένο οφθαλμό ορνιθίου. Οι τοξικές επιδράσεις στον κερατοειδή μετρώνται με: (i) ποιοτική αξιολόγηση της αδιαφάνειας, (ii) ποιοτική αξιολόγηση της βλάβης στο επιθήλιο βάσει της εφαρμογής φλουορεσκεΐνης στον οφθαλμό (κατακράτηση φλουορεσκεΐνης), (iii) ποσοτική μέτρηση της αύξησης του πάχους (οίδημα) και (iv) ποιοτική αξιολόγηση της μακροσκοπικής μορφολογικής βλάβης στην επιφάνεια. Οι αξιολογήσεις της αδιαφάνειας, του οιδήματος και της βλάβης του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία πραγματοποιούνται χωριστά και εν συνεχεία συνδυάζονται για την ταξινόμηση της οφθαλμικής ερεθιστικότητας.
3. Σε δοκιμές με τη μέθοδο ICE έχουν υποβληθεί και ερεθιστικά των οφθαλμών που προκαλούν αλλοιώσεις οι οποίες υποχωρούν εντός διαστήματος μικρότερου των 21 ημερών, καθώς και μη ερεθιστικά. Εντούτοις, δεν έχουν αξιολογηθεί επισήμως η ορθότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμών ICE για ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις κατηγορίες.
4. Στο προσάρτημα 1 παρέχονται ορισμοί.

**ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στο πρωτόκολλο της μεθόδου δοκιμών ICE της Διυπηρεσιακής Συντονιστικής Επιτροπής για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ICCVAM) (8), το οποίο καταρτίστηκε βάσει διεθνούς μελέτης επικύρωσης (4) (5) (9), με τη συνεισφορά του Ευρωπαϊκού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM), του Ιαπωνικού Κέντρου για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (JaCVAM) και του Τμήματος Τοξικολογίας και Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας του θεματικού τομέα "Ποιότητα ζωής" (Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology) του ερευνητικού οργανισμού TNO (Κάτω Χώρες). Το πρωτόκολλο βασίζεται σε στοιχεία που ελήφθησαν από δημοσιευμένα πρωτόκολλα, καθώς και στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται επί του παρόντος από τον οργανισμό TNO (10) (11) (12) (13) (14).
6. Οι περιορισμοί που προσδιορίστηκαν για την παρούσα μέθοδο βασίζονται στο ψευδοθετικό ποσοστό για τις αλκοόλες και στα ψευδοαρνητικά ποσοστά για τα στερεά και τα επιφανειοδραστικά (βλ. παράγραφο 47) (4). Όταν αποκλείονται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες που εμπίπτουν σε αυτές τις χημικές και φυσικές κατηγορίες, αυξάνεται σημαντικά η ορθότητα της ICE στα συστήματα ταξινόμησης της ΕΕ, της ΕΡΑ (Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ) και GHS (Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων) (4). Για τον σκοπό της παρούσας δοκιμασίας (δηλ. την ταυτοποίηση μόνο των διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), τα ψευδοαρνητικά ποσοστά δεν είναι κρίσιμης σημασίας, διότι οι ουσίες αυτές θα υποβληθούν ακολούθως σε δοκιμή σε κουνέλια ή σε άλλες επαρκώς επικυρωμένες δοκιμές *in vitro*, ανάλογα με τις κανονιστικές απαιτήσεις, στο πλαίσιο στρατηγικής διαδοχικών ελέγχων με μέθοδο προσέγγισης βασισμένη στο βάρος της απόδειξης. Επιπλέον, η υφιστάμενη βάση δεδομένων επικύρωσης δεν καθιστά εφικτή τη δέουσα αξιολόγηση ορισμένων χημικών κατηγοριών ή κατηγοριών προϊόντων (π.χ. των μειγμάτων). Παρόλα αυτά, οι ερευνητές θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την παρούσα μέθοδο δοκιμών για όλους τους τύπους ελεγχόμενων υλικών (συμπεριλαμβανομένων των μειγμάτων), με τα θετικά αποτελέσματα να θεωρούνται ενδεικτικά απόκρισης των οφθαλμών για διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό. Πάντως, τα θετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις αλκοόλες πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή λόγω κινδύνου υπερεκτιμημένης πρόβλεψης.
7. Όλες οι διαδικασίες με τους οφθαλμούς ορνιθίων πρέπει να συμμορφώνονται προς τους κανονισμούς και τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στην εγκατάσταση δοκιμών για τον χειρισμό υλικών ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, των ιστών και ιστικών υγρών. Συνιστάται η τήρηση των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων (15).
8. Ένας περιορισμός της μεθόδου δοκιμής συνιστάται στο ότι, αν και λαμβάνει υπόψη ορισμένες από τις επιδράσεις στους οφθαλμούς οι οποίες αξιολογήθηκαν στη μέθοδο δοκιμών οφθαλμικής ερεθιστικότητας σε κουνέλια και, εν μέρει, τη σοβαρότητά τους, δεν λαμβάνει υπόψη τους τραυματισμούς του επιπεφυκότος και της ίριδας. Επίσης, μολονότι δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση αυτής καθ'αυτήν της αναστρεψιμότητας των βλαβών του κερατοειδούς στο πλαίσιο της μεθόδου δοκιμών ICE, έχει προταθεί, βάσει των οφθαλμικών μελετών σε κουνέλια, η αξιολόγηση του αρχικού βάθους του τραύματος του κερατοειδούς για τη διάκριση μεταξύ μη αναστρέψιμων και αναστρέψιμων επιδράσεων (16). Τέλος, η μέθοδος δοκιμών ICE δεν καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του δυναμικού συστηματικής τοξικότητας που συνδέεται με την έκθεση των οφθαλμών.
9. Συνεχίζονται οι προσπάθειες για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της σκοπιμότητας και των περιορισμών της μεθόδου δοκιμών ICE ως προς τον χαρακτηρισμό των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών (βλ. επίσης παράγραφο 48). Συνιστάται επίσης στους χρήστες να παρέχουν δείγματα ή/και δεδομένα σε φορείς επικύρωσης για μια επίσημη αξιολόγηση των πιθανών μελλοντικών χρήσεων της μεθόδου δοκιμών ICE, καθώς και για τον χαρακτηρισμό των μη ισχυρών ερεθιστικών και των μη ερεθιστικών.

10. Τα εργαστήρια που διεξάγουν για πρώτη φορά την παρούσα δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιούν τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας που προβλέπονται στο προσάρτημα 2. Ένα εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί αυτές τις χημικές ουσίες για να αποδείξει την τεχνική ικανότητά του όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου δοκιμών ICE, πριν από την υποβολή δεδομένων από τη δοκιμή ICE, για κανονιστική ταξινόμηση κινδύνων.

#### ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

11. Η μέθοδος δοκιμών ICE είναι ένα οργανοτυπικό μοντέλο που εξασφαλίζει βραχυπρόθεσμη διατήρηση των οφθαλμών ορνιθίων *in vitro*. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών, η βλάβη που προκαλείται από την ελεγχόμενη ουσία αξιολογείται μέσω προσδιορισμού του οιδήματος και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς και της κατακράτησης φλουορεσκείνης. Με τις δύο τελευταίες παραμέτρους επιτυγχάνεται ποιοτική αξιολόγηση, ενώ η ανάλυση του οιδήματος του κερατοειδούς παρέχει ποσοτική αξιολόγηση. Κάθε μέτρηση είτε μετατρέπεται σε ποσοτική βαθμολογία για τον υπολογισμό ενός συνολικού δείκτη ερεθισμού είτε κατατάσσεται σε ποιοτική κατηγορία, η οποία χρησιμοποιείται για ταξινόμηση ως προς την οφθαλμική διαβρωτικότητα και την ισχυρή ερεθιστικότητα *in vitro*. Το καθένα από αυτά τα αποτελέσματα μπορεί εν συνεχεία να χρησιμοποιείται για την πρόγνωση του δυναμικού οφθαλμικής διαβρωτικότητας και ισχυρής ερεθιστικότητας *in vivo* μιας ελεγχόμενης ουσίας (βλ. κριτήρια απόφασης).

#### Προέλευση και ηλικία των οφθαλμών των ορνιθίων

12. Έχει παγιωθεί ιστορικά η χρήση, για τη δοκιμή, οφθαλμών που συλλέγονται από ορνίθια που θανατώνονται σε σφαγείο για κατανάλωση από τον άνθρωπο, γεγονός που συνεπάγεται ότι δεν απαιτείται η χρήση πειραματόζωων. Χρησιμοποιούνται μόνο οφθαλμοί υγιών ζώων που θεωρούνται κατάλληλα για είσοδο στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα.
13. Αν και δεν έχει διενεργηθεί ελεγχόμενη μελέτη για την αξιολόγηση της βέλτιστης ηλικίας των ορνιθίων, στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμής χρησιμοποιούνται κατά παράδοση τα νεαρά ορνίθια που οδηγούνται συνήθως σε σφαγείο πουλερικών (ηλικίας περίπου 7 εβδομάδων και βάρους 1,5 – 2,5 kg).

#### Συλλογή και μεταφορά των οφθαλμών στο εργαστήριο

14. Τα κεφάλια πρέπει να αφαιρούνται αμέσως μετά την αναισθητοποίηση των ορνιθίων, συνήθως με ηλεκτροπληξία, και την τομή στον τράχηλο για αφαιμάξη. Η εγκατάσταση από την οποία προέρχονται τα ορνίθια πρέπει να βρίσκεται κοντά στο εργαστήριο ούτως ώστε τα κεφάλια να μεταφέρονται ταχέως από το σφαγείο στο εργαστήριο προκειμένου να ελαχιστοποιείται η υποβάθμιση ή/και η βακτηριδιακή μόλυνση. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της συλλογής των κεφαλών των ορνιθίων και της χρήσης των οφθαλμών στη μέθοδο δοκιμών ICE πρέπει να είναι το μικρότερο δυνατόν (κατά κανόνα εντός δύο ωρών) και να αποδεικνύεται ότι δεν υπονομεύει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα αυτά βασίζονται στα κριτήρια επιλογής των οφθαλμών, καθώς και στις αποκρίσεις των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων. Όλοι οι οφθαλμοί που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία πρέπει να προέρχονται από την ίδια ομάδα οφθαλμών που συλλέχθηκαν συγκεκριμένη ημέρα.
15. Επειδή οι οφθαλμοί ανατέμνονται στο εργαστήριο, οι κεφαλές μεταφέρονται από το σφαγείο ολόκληρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εντός πλαστικών δοχείων που διατηρούνται υγρά με πετσέτες εμποτισμένες με ισότονο αλατούχο διάλυμα (φυσιολογικό ορό).

#### Κριτήρια επιλογής για τους οφθαλμούς που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο ICE

16. Οφθαλμοί με υψηλή αρχική χρώση φλουορεσκείνης ( $> 0,5$ ) ή βαθμολογία αδιαφάνειας κερατοειδούς  $> 0,5$  μετά την εξόρυξή τους, απορρίπτονται.
17. Κάθε ομάδα αγωγής και κάθε ομάδα παράλληλων θετικών μαρτύρων αποτελείται από τρεις τουλάχιστον οφθαλμούς. Η ομάδα αρνητικών μαρτύρων ή μαρτύρων με διαλύτη (εάν δεν χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός ως διαλύτης) αποτελείται από τουλάχιστον έναν οφθαλμό.

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

##### Προετοιμασία των οφθαλμών

18. Τα βλέφαρα εκτέμνονται προσεκτικά κατά τρόπο ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή. Η ακεραιότητα του κερατοειδούς αξιολογείται ταχέως με την ενστάλαξη σταγόνας νατριούχου φλουορεσκείνης 2 % w/v στην επιφάνεια του κερατοειδούς για λίγα δευτερόλεπτα. Ακολουθεί έκπλυση του κερατοειδούς με ισότονο φυσιολογικό ορό. Οι οφθαλμοί που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με φλουορεσκείνη εξετάζονται με σχισμοειδή λυχνία για να διαπιστώνεται αν είναι άδικτος ο κερατοειδής (κατακράτηση φλουορεσκείνης και αδιαφάνεια κερατοειδούς  $\leq 0,5$ ).
19. Εάν ο κερατοειδής είναι άδικτος, ο οφθαλμός εκτέμνεται περαιτέρω από το κρανίο με προσοχή, κατά τρόπο ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή. Ο βολβός αποσπάται από τον οφθαλμικό κόγχο με χειρουργικές λαβίδες, με τις οποίες συγκρατείται σταθερά η σκαρδαμυκτική μεμβράνη, ενώ αποκόπτονται οι οφθαλμικοί μυς με κυρτό αμβλύ ψαλίδι. Είναι σημαντικό να αποφεύγεται η άσκηση υπερβολικής πίεσης ώστε να μην προκαλείται βλάβη στον κερατοειδή (τεχνητά σφάλματα λόγω συμπίεσης).
20. Κατά την απόσπαση του οφθαλμού από τον οφθαλμικό κόγχο πρέπει να παραμένει συνδεδεμένο ένα ορατό τμήμα του οπτικού νεύρου. Μετά την αφαίρεσή του από τον οφθαλμικό κόγχο, ο οφθαλμός τοποθετείται σε απορροφητικό τολύπιο και αφαιρούνται η σκαρδαμυκτική μεμβράνη και ο λοιπός συνδετικός ιστός.

21. Ο εξορυγμένος οφθαλμός στερεώνεται σε σφιγκτήρα από ανοξείδωτο χάλυβα με τον κερατοειδή σε κατακόρυφη θέση. Ο σφιγκτήρας μεταφέρεται εν συνεχεία σε θάλαμο της συσκευής υπέρτηξης (16). Οι σφιγκτήρες πρέπει να τοποθετούνται στη συσκευή υπέρτηξης κατά τρόπο ώστε ολόκληρος ο κερατοειδής να καλύπτεται με τον ισότονο φυσιολογικό ορό. Η θερμοκρασία των θαλάμων της συσκευής υπέρτηξης πρέπει να είναι ελεγχόμενη στους  $32 \pm 1,5$  °C. Στο προσάρτημα 3 παρατίθεται διάγραμμα τυπικής συσκευής υπέρτηξης και των σφιγκτήρων οφθαλμών, που κυκλοφορούν στο εμπόριο ή κατασκευάζονται κατά παραγγελία. Η συσκευή μπορεί να τροποποιείται ούτως ώστε να προσαρμόζεται στις ανάγκες του εκάστοτε εργαστηρίου (π.χ. να χωράει διαφορετικό αριθμό οφθαλμών).
22. Μετά την τοποθέτησή τους στη συσκευή υπέρτηξης, οι οφθαλμοί επανεξετάζονται με μικροσκόπιο με σχισμοειδή λυχνία ούτως ώστε να διαπιστωθεί ότι δεν υπέστησαν βλάβη κατά τη διαδικασία ανατομής. Παράλληλα, πρέπει να μετράται το πάχος του κερατοειδούς στην κορυφή του με το παχύμετρο της σχισμοειδούς λυχνίας. Οι οφθαλμοί με (i) κατακράτηση φλουορεσκεΐνης > 0,5, (ii) αδιαφάνεια κερατοειδούς > 0,5 ή (iii) περαιτέρω ενδείξεις βλάβης πρέπει να αντικαθίστανται. Από τους οφθαλμούς που δεν απορρίπτονται βάσει οποιουδήποτε από τα προαναφερθέντα κριτήρια, οι μεμονωμένοι οφθαλμοί με πάχος κερατοειδούς που αποκλίνει κατά περισσότερο από 10 % από τη μέση τιμή για το σύνολο των οφθαλμών, πρέπει να απορρίπτονται. Οι χρήστες πρέπει να γνωρίζουν ότι από μικροσκοπία με σχισμοειδείς λυχνίες ενδέχεται να προκύψουν διαφορετικές μετρήσεις του πάχους του κερατοειδούς ανάλογα με το πλάτος της σχισμής. Το πλάτος της σχισμής πρέπει να ρυθμίζεται στα 0,095 mm.
23. Όταν όλοι οι οφθαλμοί έχουν εξετασθεί και εγκριθεί, επωάζονται επί περίπου 45 έως 60 λεπτά για την εξισορρόπησή τους με το σύστημα δοκιμής πριν από τη δοσιμέτρηση. Μετά την παρέλευση του διαστήματος εξισορρόπησης, καταγράφεται η μηδενική μέτρηση αναφοράς ως αρχική τιμή του πάχους και της αδιαφάνειας του κερατοειδούς (χρόνος = 0). Η βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης κατά την ανατομή χρησιμοποιείται ως η αρχική μέτρηση για το συγκεκριμένο τελικό σημείο.

#### Εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας

24. Αμέσως μετά τις μηδενικές μετρήσεις αναφοράς, ο οφθαλμός (στον σφιγκτήρα του) απομακρύνεται από τη συσκευή υπέρτηξης, τοποθετείται σε οριζόντια θέση και στον κερατοειδή εφαρμόζεται η ελεγχόμενη ουσία.
25. Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες υποβάλλονται κατά κανόνα σε δοκιμή χωρίς να αραιώνονται, αλλά μπορούν να αραιώνονται εάν κριθεί απαραίτητο (π.χ. στο πλαίσιο του σχεδιασμού της μελέτης). Ο προτιμώμενος διαλύτης για την αραιώση των ουσιών είναι ο φυσιολογικός ορός. Μπορούν όμως να χρησιμοποιούνται και εναλλακτικοί διαλύτες υπό ελεγχόμενες συνθήκες, αλλά πρέπει να αποδεικνύεται η καταλληλότητά τους.
26. Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες εφαρμόζονται στον κερατοειδή κατά τρόπο ώστε ολόκληρη η επιφάνειά του να καλύπτεται ομοιογενώς με την ελεγχόμενη ουσία. Ο τυπικός όγκος είναι 0,03 mL.
27. Εάν είναι εφικτό, οι στερεές ουσίες πρέπει να κονιοποιούνται σε όσο το δυνατόν λεπτότερους κόκκους σε ίδιο με ύπερο, ή με συγκρίσιμο εργαλείο λειοτρίβησης. Η σκόνη εφαρμόζεται στον κερατοειδή κατά τρόπο ώστε η επιφάνειά του να καλύπτεται ομοιόμορφα με την ελεγχόμενη ουσία. Η τυπική ποσότητα είναι 0,03 g.
28. Η ελεγχόμενη ουσία (υγρή ή στερεά) εφαρμόζεται επί 10 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια εκπλύνεται από τον οφθαλμό με ισότονο φυσιολογικό ορό (περίπου 20 mL) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως, ο οφθαλμός (στον σφιγκτήρα του) επαναφέρεται στη συσκευή υπέρτηξης στην αρχική κατακόρυφη θέση.

#### Ουσίες-μάρτυρες

29. Κάθε πείραμα πρέπει να περιλαμβάνει παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες ή μάρτυρες με διαλύτη/φορέα και θετικούς μάρτυρες.
30. Κατά τη δοκιμή υγρών χωρίς αραιώση ή στερεών, ως παράλληλος αρνητικός μάρτυρας στη μέθοδο δοκιμών ICE χρησιμοποιείται φυσιολογικός ορός για την ανίχνευση μη ειδικών αλλαγών στο σύστημα δοκιμής και για να εξασφαλίζεται ότι οι συνθήκες δοκιμασίας δεν προκαλούν πλασματική απόκριση ερεθισμού.
31. Κατά τη δοκιμή αραιωμένων υγρών, στη μέθοδο δοκιμών περιλαμβάνεται ομάδα παράλληλων μαρτύρων με διαλύτη/φορέα για την ανίχνευση μη ειδικών αλλαγών στο σύστημα δοκιμής και για να εξασφαλίζεται ότι οι συνθήκες δοκιμής δεν προκαλούν πλασματική απόκριση ερεθισμού. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 25, μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο διαλύτης/φορέας για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής.



32. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται γνωστό ερεθιστικό των οφθαλμών ως παράλληλος θετικός μάρτυρας ούτως ώστε να επιβεβαιώνεται η πρόκληση της κατάλληλης απόκρισης. Δεδομένου ότι στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών η δοκιμασία ICE χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών ή ισχυρών ερεθιστικών, ο θετικός μάρτυρας πρέπει να είναι ουσία αναφοράς που προκαλεί σοβαρή απόκριση στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μεθόδου. Ωστόσο, για να διασφαλιστεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό. Πρέπει να παράγονται επαρκή δεδομένα *in vitro* για τον θετικό μάρτυρα ούτως ώστε να είναι εφικτός ο υπολογισμός ενός στατιστικώς καθορισμένου αποδεκτού εύρους του θετικού μάρτυρα. Εάν για έναν συγκεκριμένο θετικό μάρτυρα δεν διατίθενται επαρκή ιστορικά δεδομένα από τη μέθοδο δοκιμών ICE, ενδέχεται να απαιτείται η διεξαγωγή μελετών για την απόκτηση αυτών των πληροφοριών.
33. Παραδείγματα θετικών μαρτύρων για υγρές ελεγχόμενες ουσίες είναι το οξικό οξύ 10 % ή το χλωριούχο βενζαλκόνιο 5 %, ενώ παραδείγματα θετικών μαρτύρων για στερεές ελεγχόμενες ουσίες είναι το υδροξείδιο του νατρίου ή το ιμιδαζόλιο.
34. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν σημείο αναφοράς είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του δυναμικού οφθαλμικού ερεθισμού άγνωστων χημικών ουσιών συγκεκριμένης χημικής κατηγορίας ή κατηγορίας προϊόντων ή για την αξιολόγηση του σχετικού ερεθιστικού δυναμικού ενός ερεθιστικού των οφθαλμών εντός συγκεκριμένου εύρους αποκρίσεων ερεθισμού.

#### Μετρούμενα τελικά σημεία

35. Οι κερατοειδείς που έχουν υποβληθεί σε αγωγή αξιολογούνται προ της αγωγής και στα 30, 75, 120, 180 και 240 λεπτά ( $\pm 5$  λεπτά) από την έκπλυση που ακολουθεί την αγωγή. Τα χρονικά αυτά σημεία εξασφαλίζουν επαρκή αριθμό μετρήσεων κατά τη διάρκεια του τετράωρου διαστήματος αγωγής, παρέχοντας παράλληλα επαρκή χρόνο μεταξύ των μετρήσεων για τις απαιτούμενες παρατηρήσεις επί όλων των οφθαλμών.
36. Τα αξιολογούμενα τελικά σημεία είναι η αδιαφάνεια, το οίδημα του κερατοειδούς, η κατακράτηση φλουορεσκείνης και οι επιδράσεις στη μορφολογία (π.χ. εντύπωμα ή χαλάρωση του επιθηλίου). Όλα τα τελικά σημεία, με εξαίρεση την κατακράτηση φλουορεσκείνης (η οποία προσδιορίζεται μόνο προ της αγωγής και 30 λεπτά μετά την έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία) προσδιορίζονται σε καθένα από τα ανωτέρω τελικά σημεία.
37. Συνιστάται η λήψη φωτογραφιών για την τεκμηρίωση της αδιαφάνειας του κερατοειδούς, της κατακράτησης φλουορεσκείνης, των μορφολογικών επιδράσεων και, εάν διενεργείται, της παθολογοανατομικής εξέτασης.
38. Μετά την τελική εξέταση στις τέσσερις ώρες, συνιστάται στους χρήστες να διατηρούν τους οφθαλμούς σε κατάλληλο συντηρητικό (π.χ. ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΐδης [φορμόλη]) για πιθανή παθολογοανατομική εξέταση.
39. Το οίδημα του κερατοειδούς προσδιορίζεται βάσει μετρήσεων του πάχους του κερατοειδούς με οπτικό παχύμετρο σε σχισμοειδή λυχνία, εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό και υπολογίζεται βάσει του ακόλουθου τύπου:

$$\left( \frac{\text{πάχος κερατοειδούς τη στιγμή } t - \text{πάχος κερατοειδούς τη στιγμή } = 0}{\text{πάχος κερατοειδούς τη στιγμή } = 0} \right) \times 100$$

40. Υπολογίζεται το μέσο ποσοστό οιδήματος του κερατοειδούς για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής και για όλα τα χρονικά σημεία παρατήρησης. Βάσει της υψηλότερης μέσης βαθμολογίας για το οίδημα του κερατοειδούς, όπως παρατηρείται ανεξαρτήτως χρονικού σημείου, προκύπτει για κάθε ελεγχόμενη ουσία συνολική βαθμολογία κατηγορίας.
41. Η αδιαφάνεια του κερατοειδούς υπολογίζεται βάσει της επιφάνειας του κερατοειδούς με την πυκνότερη αδιαφάνεια. Υπολογίζεται η μέση αδιαφάνεια κερατοειδούς για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής και για όλα τα χρονικά σημεία παρατήρησης. Βάσει της υψηλότερης μέσης βαθμολογίας για την αδιαφάνεια του κερατοειδούς, όπως παρατηρείται ανεξαρτήτως χρονικού σημείου, προκύπτει για κάθε ελεγχόμενη ουσία συνολική βαθμολογία κατηγορίας (πίνακας 1).

Πίνακας 1

#### Βαθμολογία αδιαφάνειας κερατοειδούς

Βαθμολογία	Παρατήρηση
0	Δεν παρατηρείται αδιαφάνεια
0,5	Αμυδρή αδιαφάνεια

Βαθμολογία	Παρατήρηση
1	Διάσπαρτες ή διάχυτες αδιαφανείς περιοχές, σαφώς διακρινόμενες λεπτομέρειες της ίριδας
2	Ευδιάκριτη ημιδιαφανής επιφάνεια, ελαφρά συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας
3	Σοβαρή αδιαφάνεια του κερατοειδούς, πλήρης συγκάλυψη των λεπτομερειών της ίριδας, μόλις διακρινόμενο μέγεθος της κόρης
4	Πλήρως αδιαφανής κερατοειδής, μη διακρινόμενη ίριδα

42. Υπολογίζεται η μέση τιμή κατακράτησης φλουορεσκεΐνης για όλους τους οφθαλμούς της δοκιμής μόνο στο χρονικό σημείο παρατήρησης των 30 λεπτών, το οποίο χρησιμοποιείται για τη συνολική βαθμολογία κατηγορίας που προκύπτει για κάθε ελεγχόμενη ουσία (πίνακας 2).

Πίνακας 2

Βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης

Βαθμολογία	Παρατήρηση
0	Δεν παρατηρείται κατακράτηση φλουορεσκεΐνης
0,5	Αμυδρή χρώση μεμονωμένων κυττάρων
1	Διάχυτη χρώση μεμονωμένων κυττάρων σε ολόκληρη την υποβληθείσα σε αγωγή επιφάνεια του κερατοειδούς
2	Εστιακή ή συρρέουσα πυκνή χρώση μεμονωμένων κυττάρων
3	Κατακράτηση φλουορεσκεΐνης σε μεγάλες συρρέουσες επιφάνειες

43. Στις μορφολογικές επιδράσεις περιλαμβάνεται το "εντύωμα" των επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς, η "χαλάρωση" του επιθηλίου, η "τράχυνση" της επιφάνειας του κερατοειδούς και η "πρόσφυση" της ελεγχόμενης ουσίας στον κερατοειδή. Τα ευρήματα αυτά ποικίλλουν σε σοβαρότητα και ενδέχεται να παρατηρούνται ταυτόχρονα. Η ταξινόμησή τους είναι υποκειμενική ανάλογα με την ερμηνεία του ερευνητή.

## ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

## Αξιολόγηση των δεδομένων

44. Τα αποτελέσματα σχετικά με την αδιαφάνεια και το οίδημα του κερατοειδούς και με την κατακράτηση φλουορεσκεΐνης πρέπει να αξιολογούνται χωριστά ώστε να προκύπτει κατηγορία ICE για κάθε τελικό σημείο. Ακολούθως, οι κατηγορίες ICE για κάθε τελικό σημείο συνδυάζονται για την ταξινόμηση της ερεθιστικότητας κάθε ελεγχόμενης ουσίας.

## Κριτήρια απόφασης

45. Μετά την αξιολόγηση κάθε τελικού σημείου, είναι εφικτή η κατάταξη σε κατηγορίες ICE βάσει προκαθορισμένου εύρους. Η ερμηνεία του πάχους του κερατοειδούς (πίνακας 3), της αδιαφάνειάς του (πίνακας 4) και της κατακράτησης φλουορεσκεΐνης (πίνακας 5) βάσει τεσσάρων κατηγοριών ICE πραγματοποιείται σύμφωνα με τις ακόλουθες κλίμακες:

Πίνακας 3

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για το πάχος του κερατοειδούς

Μέσο οίδημα κερατοειδούς (%) (*)	Κατηγορία ICE
0 έως 5	I
> 5 έως 12	II
> 12 έως 18 (> 75 min μετά την αγωγή)	II
> 12 έως 18 (≤ 75 min μετά την αγωγή)	III
> 18 έως 26	III

Μέσο οίδημα κερατοειδούς (%) (*)	Κατηγορία ICE
> 26 έως 32 (> 75 min μετά την αγωγή)	III
> 26 έως 32 (≤ 75 min μετά την αγωγή)	IV
> 32	IV

(\*) Η βαθμολογία οιδήματος του κερατοειδούς ισχύει μόνο εάν το πάχος μετράται με σχισμοειδή λυχνία Haag-Streit BP900, με παχύμετρο αριθ. I και ρύθμιση του πλάτους σχισμής στο 9½, ήτοι 0,095 mm. Οι χρήστες πρέπει να γνωρίζουν ότι από μικροσκόπια με τις σχισμοειδείς λυχνίες ενδέχεται να προκύψουν διαφορετικές μετρήσεις του πάχους του κερατοειδούς ανάλογα με το πλάτος της σχισμής.

Πίνακας 4

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για την αδιαφάνεια

Μέση βαθμολογία μέγιστης αδιαφάνειας (*)	Κατηγορία ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(\*) Βλ. πίνακα 1.

Πίνακας 5

Κριτήρια ταξινόμησης ICE για τη μέση κατακράτηση φλουορεσκεΐνης

Μέση βαθμολογία κατακράτησης φλουορεσκεΐνης στα 30 λεπτά μετά την αγωγή (*)	Κατηγορία ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(\*) Βλ. πίνακα 2.

46. Η συνολική ταξινόμηση ερεθιστικότητας *in vitro* για μια ελεγχόμενη ουσία αξιολογείται βάσει της ταξινόμησης ερεθιστικότητας που αντιστοιχεί στον συνδυασμό των κατηγοριών οιδήματος του κερατοειδούς, αδιαφάνειας του κερατοειδούς και κατακράτησης φλουορεσκεΐνης, όπως εμφανίζεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6

Συνολικές ταξινομήσεις ερεθιστικότητας *in vitro*

Ταξινόμηση	Συνδυασμοί των 3 τελικών σημείων
Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Αδιαφάνεια του κερατοειδούς ≥ 3 στα 30 min (σε τουλάχιστον 2 οφθαλμούς) Αδιαφάνεια του κερατοειδούς = 4 σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο (σε τουλάχιστον 2 οφθαλμούς) Σοβαρή χαλάρωση του επιθηλίου (σε τουλάχιστον 1 οφθαλμό)

(\*) Λιγότερο πιθανοί συνδυασμοί.

47. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1, εάν η ελεγχόμενη ουσία δεν χαρακτηρίζεται ως διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών, πρέπει να διεξάγονται επιπρόσθετες δοκιμές για ταξινόμηση και επισήμανση. Η μέθοδος δοκιμών ICE έχει συνολική ορθότητα 83 % (120/144) έως 87 % (134/154), ψευδοθετικό ποσοστό 6 % (7/122) έως 8 % (9/116) και ψευδοαρνητικό ποσοστό 41 % (13/32) έως 50 % (15/30) για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών και ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών, σε σύγκριση με τα δεδομένα από τη μέθοδο οφθαλμικών δοκιμών *in vivo* σε κουνέλια, τα οποία ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης της EPA (1), της EE (2) ή GHS (3). Όταν αποκλείονται από τη βάση δεδομένων οι ουσίες ορισμένων κατηγοριών, χημικών (αλκοόλες και επιφανειοδραστικά) και φυσικών (στερεά), η ορθότητα της ICE στα συστήματα ταξινόμησης της EE, της EPA και GHS κυμαίνεται από 91 % (75/82) έως 92 % (69/75), ενώ τα ψευδοθετικά ποσοστά κυμαίνονται από 5 % (4/73) έως 6 % (4/70) και τα ψευδοαρνητικά από 29 % (2/7) έως 33 % (3/9) (4).
48. Ακόμη και εάν μια ελεγχόμενη ουσία δεν ταξινομηθεί ως διαβρωτικό ή ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών, τα δεδομένα από την ICE μπορούν να χρησιμεύσουν, σε συνδυασμό με δεδομένα από την οφθαλμική δοκιμή *in vivo* σε κουνέλια ή από επαρκώς επικυρωμένη δοκιμή *in vitro*, στην περαιτέρω αξιολόγηση της σκοπιμότητας και των περιορισμών της μεθόδου δοκιμών ICE για τον χαρακτηρισμό μη ισχυρών ερεθιστικών και μη ερεθιστικών (καταρτίζεται έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με τη χρήση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro*).

#### Κριτήρια αποδοχής της μελέτης

49. Μια δοκιμή θεωρείται αποδεκτή εάν για τους παράλληλους αρνητικούς μάρτυρες ή μάρτυρες με φορέα/διαλύτη και τους παράλληλους θετικούς μάρτυρες προκύπτει ταξινόμηση ερεθιστικότητας που εμπίπτει στις κατηγορίες των μη ερεθιστικών και των ισχυρών ερεθιστικών/διαβρωτικών, αντιστοίχως.

#### Έκθεση δοκιμής

50. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία, εφόσον αυτά έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης:

##### Ελεγχόμενες ουσίες και μάρτυρες

χημική(ές) ονομασία(ες), όπως ο συντακτικός τύπος που χρησιμοποιείται από την υπηρεσία Chemical Abstracts Service (CAS), συνοδευόμενη(ες) από άλλες ονομασίες, εφόσον είναι γνωστές

αριθμός μητρώου CAS (RN), εάν είναι γνωστός

καθαρότητα και σύνθεση της ουσίας ή του μείγματος (σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία), εφόσον τα στοιχεία αυτά είναι διαθέσιμα

φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η φυσική κατάσταση, η πτητικότητα, το pH, η σταθερότητα, η χημική κατηγορία, η υδατοδιαλυτότητα, που έχουν σημασία για τη διενέργεια της μελέτης

τυχόν επεξεργασία των ελεγχόμενων ουσιών/μαρτύρων πριν από τη δοκιμή (π.χ. θέρμανση, κωνιοποίηση)

σταθερότητα, εφόσον είναι γνωστή.

##### Πληροφορίες σχετικά με τον χορηγό και την εγκατάσταση δοκιμών

όνομα και διεύθυνση του χορηγού, της εγκατάστασης δοκιμών και του διευθυντή της μελέτης

προέλευση των οφθαλμών (π.χ. εγκατάσταση από την οποία συλλέχθηκαν)

συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς των οφθαλμών (π.χ. ημερομηνία και χρόνος συλλογής των οφθαλμών, χρονικό διάστημα πριν από την έναρξη της δοκιμής)

εάν είναι διαθέσιμα, τα ειδικά χαρακτηριστικά των ζώων από τα οποία συλλέχθηκαν οι οφθαλμοί (π.χ. ηλικία, φύλο, βάρος του ζώου δότη).

##### Ατιολόγηση της μεθόδου και του πρωτοκόλλου δοκιμής που χρησιμοποιούνται

##### Ακεραιότητα της μεθόδου δοκιμής

διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της ακεραιότητας (ορθότητα και αξιοπιστία) της μεθόδου δοκιμής με την πάροδο του χρόνου (π.χ. περιοδικές δοκιμές των ουσιών ελέγχου ικανότητας, χρήση ιστορικών δεδομένων για τους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες).

*Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής*

εάν υπάρχει, το αποδεκτό εύρος τιμών για τους παράλληλους μάρτυρες συγκριτικής αξιολόγησης βάσει ιστορικών δεδομένων.

*Συνθήκες δοκιμής*

περιγραφή του χρησιμοποιούμενου συστήματος δοκιμής

χρησιμοποιούμενη σχισμοειδής λυχνία (π.χ. μοντέλο)

ρυθμίσεις του χρησιμοποιούμενου μικροσκοπίου σχισμοειδούς λυχνίας

πληροφορίες σχετικά με τους χρησιμοποιούμενους οφθαλμούς ορνιθίων, συμπεριλαμβανομένων δηλώσεων σχετικά με την ποιότητά τους

λεπτομέρειες σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία δοκιμής

χρησιμοποιούμενη(ες) συγκέντρωση(εις) της ελεγχόμενης ουσίας

περιγραφή τυχόν τροποποιήσεων της διαδικασίας δοκιμής

παραπομπή σε ιστορικά δεδομένα του μοντέλου (π.χ. αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, ουσίες ελέγχου ικανότητας, ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν σημείο αναφοράς)

περιγραφή των χρησιμοποιούμενων κριτηρίων αξιολόγησης.

*Αποτελέσματα*

περιγραφή άλλων παρατηρούμενων επιδράσεων

ανάλογα με την περίπτωση, φωτογραφίες του οφθαλμού.

*Συζήτηση των αποτελεσμάτων**Συμπέρασμα***BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16ης Δεκεμβρίου 2008, για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006. ΕΕ L 353 της 31.12.2008, σ. 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

[[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev02/02files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html)]

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

[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmter.htm](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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:

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

- (6) ΕΚ (2006). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ. ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)]
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. 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). NIH Publication No.: 07-4517. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmer.htm](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: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[[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). Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[<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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[[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. Διατίθεται στον δικτυακό τόπο:  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_brd\\_bcop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)]

## Προσάρτημα 1

## ΟΡΙΣΜΟΙ

**Ακρίβεια:** η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της μεθόδου δοκιμών και των αποδεκτών τιμών αναφοράς. Αποτελεί μέτρο των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών και μία από τις πτυχές της καταλληλότητας. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται αναλλακτικά προς τη «συμφωνία» για να δηλώσει το ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων μιας μεθόδου δοκιμών.

**Ουσία:** που χρησιμοποιείται σαν σημείο αναφοράς: ουσία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για σύγκριση με ελεγχόμενη ουσία. Μια ουσία που χρησιμοποιείται σαν σημείο αναφοράς πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες: (i) σταθερή(ές) και αξιόπιστη(ες) πηγή(ές), (ii) δομική και λειτουργική ομοιότητα προς την κατηγορία των ελεγχόμενων ουσιών, (iii) γνωστά φυσικά/χημικά χαρακτηριστικά, (iv) δεδομένα τεκμηρίωσης γνωστών επιδράσεων και (v) γνωστή ισχύ στο εύρος της επιθυμητής απόκρισης.

**Κερατοειδής:** το διαφανές τμήμα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμικού βολβού το οποίο καλύπτει την ίριδα και την κόρη και επιτρέπει την είσοδο φωτός στο εσωτερικό του ματιού.

**Αδιαφάνεια κερατοειδούς:** μέτρηση του βαθμού θολερότητας του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία. Η αυξημένη αδιαφάνειά του είναι ενδεικτική βλάβης του κερατοειδούς.

**Οίδημα κερατοειδούς:** αντικειμενική μέτρηση, στο πλαίσιο της δοκιμής ICE, του βαθμού διάτασης του κερατοειδούς κατόπιν έκθεσης σε ελεγχόμενη ουσία. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό και υπολογίζεται βάσει των αρχικών (προ της χορήγησης δόσης) μετρήσεων του πάχους του κερατοειδούς και των μετρήσεων του πάχους που καταγράφονται σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την έκθεση στο ελεγχόμενο υλικό κατά τη δοκιμή ICE. Ο βαθμός οιδήματος του κερατοειδούς είναι ενδεικτικός βλάβης του κερατοειδούς.

**Κατηγορία EPA 1:** διάβρωση (μη αναστρέψιμη καταστροφή οφθαλμικού ιστού) ή προσβολή ή ερεθισμός του κερατοειδούς που εμμένει για περισσότερες από 21 ημέρες (1).

**Κατηγορία EE R41:** βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (2).

**Ψευδοαρνητικό ποσοστό:** το ποσοστό όλων των θετικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως αρνητικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

**Ψευδοθετικό ποσοστό:** το ποσοστό όλων των αρνητικών ουσιών που εσφαλμένα χαρακτηρίζονται ως θετικές από μια μέθοδο δοκιμών. Αποτελεί δείκτη των επιδόσεων της μεθόδου δοκιμών.

**Κατακράτηση φλουορεσκεΐνης:** υποκειμενική μέτρηση, στο πλαίσιο της δοκιμής ICE, του βαθμού κατακράτησης νατριούχου φλουορεσκεΐνης από τα κερατοειδικά επιθηλιακά κύτταρα κατόπιν έκθεσης στην ελεγχόμενη ουσία. Ο βαθμός κατακράτησης φλουορεσκεΐνης είναι ενδεικτικός βλάβης του κερατοειδικού επιθηλίου.

**GHS (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals/ΠΕΣ - Παγκόσμιο Εναρμονισμένο Σύστημα Ταξινόμησης και Επισήμανσης των Χημικών Προϊόντων):** σύστημα που προτείνει την ταξινόμηση των χημικών προϊόντων (ουσιών και μειγμάτων) με βάση τυποποιημένες κατηγορίες ταξινόμησης και κλίμακες φυσικών κινδύνων και κινδύνων για την υγεία και το περιβάλλον και καλύπτει τα αντίστοιχα επικοινωνιακά στοιχεία, όπως εικονογράμματα, προειδοποιητικές λέξεις, δηλώσεις κινδύνου, δηλώσεις προφύλαξης και δελτία δεδομένων ασφαλείας για τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τις δυσμενείς επιδράσεις των εν λόγω προϊόντων, με σκοπό την προστασία των ανθρώπων (εργοδοτών, εργαζομένων, μεταφορέων, καταναλωτών και διασωστών) και του περιβάλλοντος (3).

**Κατηγορία GHS 1:** βλάβη οφθαλμικού ιστού ή σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, κατόπιν εφαρμογής ελεγχόμενης ουσίας στην πρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται πλήρως εντός 21 ημερών από την εφαρμογή (3).

**Κίνδυνος:** εγγενής ιδιότητα ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης που μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις όταν οργανισμός, σύστημα ή (υπό) πληθυσμός εκτεθεί στον συγκεκριμένο παράγοντα.

**Αρνητικός μάρτυρας:** δείγμα-αντίγραφο που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και δεν υποβάλλεται σε αγωγή. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες ούτως ώστε να διαπιστώνεται αν ο διαλύτης αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

**Μη ερεθιστικά:** ουσίες που δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικές για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA I, II, ή III ούτε κατηγορίας EE R41 ή R36 ούτε κατηγορίας GHS 1, 2A ή 2B (1)(2)(3).

**Διαβρωτικό των οφθαλμών:** α) ουσία που προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, β) ουσία που ταξινομείται ως διαβρωτική για τους οφθαλμούς κατηγορίας GHS 1, EPA I ή EE R41 (1)(2)(3).

**Ερεθιστικό των οφθαλμών:** α) ουσία που προκαλεί αναστρέψιμη αλλαγή στους οφθαλμούς κατόπιν εφαρμογής στην πρόσδια επιφάνεια του οφθαλμού, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς κατηγορίας EPA II ή III, EE R36 ή GHS 2A ή 2B (1)(2)(3).

**Ισχυρό ερεθιστικό των οφθαλμών:** α) ουσία που προκαλεί βλάβη στους οφθαλμικούς ιστούς, κατόπιν εφαρμογής στην πρόσδια επιφάνεια του οφθαλμού, η οποία δεν αναστρέφεται εντός 21 ημερών από την εφαρμογή, ή που προκαλεί σοβαρή φυσική οπτική εξασθένιση, β) ουσία που ταξινομείται ως ερεθιστική για τους οφθαλμούς στην κατηγορία GHS 1, EPA I ή EE R41 (1)(2)(3).

**Θετικός μάρτυρας:** δείγμα-αντίγραφο που περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής και υποβάλλεται σε αγωγή με ουσία που είναι γνωστό ότι προκαλεί θετική απόκριση. Για να διασφαλισθεί η δυνατότητα αξιολόγησης της μεταβλητότητας της απόκρισης στον θετικό μάρτυρα σε συνάρτηση με τον χρόνο, το μέγεθος της σοβαρής απόκρισης δεν πρέπει να είναι υπερβολικό.

**Αξιοπιστία:** μέτρο του βαθμού στον οποίο μια μέθοδος δοκιμών μπορεί να αναπαραχθεί ενδοεργαστηριακά και διεργαστηριακά με την πάροδο του χρόνου όταν εφαρμόζεται με το ίδιο πρωτόκολλο. Αξιολογείται μέσω υπολογισμού της ενδο- και της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

**Σχιμοειδής λυχνία:** όργανο για την απευθείας εξέταση του οφθαλμού υπό μεγέθυνση με διοφθάλμιο μικροσκόπιο μέσω της δημιουργίας στερεοσκοπικής όρθιας εικόνας. Στη μέθοδο δοκιμής ICE, το συγκεκριμένο όργανο χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των πρόσθιων δομών του οφθαλμού ορνιθίου καθώς και για την αντικειμενική μέτρηση του πάχους του κερατοειδούς με προσαρτημένο παχύμετρο.

**Μάρτυρας με διαλύτη/φορέα:** δείγμα που δεν υποβάλλεται σε αγωγή και περιέχει όλα τα στοιχεία ενός συστήματος δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη ή του φορέα. Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή μαζί με τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία και με άλλα δείγματα-μάρτυρες, με σκοπό τον καθορισμό της βασικής απόκρισης των δειγμάτων που υποβάλλονται σε αγωγή με την ελεγχόμενη ουσία διαλυμένη στον ίδιο διαλύτη ή φορέα. Όταν το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε δοκιμή με παράλληλο αρνητικό μάρτυρα, υποδεικνύει επίσης αν ο διαλύτης ή ο φορέας αλληλεπιδρά με το σύστημα δοκιμής.

**Κλιμακωτή δοκιμή:** στρατηγική δοκιμών κατά στάδια, στο πλαίσιο της οποίας όλες οι υφιστάμενες πληροφορίες για μια ελεγχόμενη ουσία εξετάζονται με συγκεκριμένη σειρά, με χρήση διαδικασίας βάρους της απόδειξης σε κάθε στάδιο, προκειμένου να διαπιστώνεται, πριν από τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αν για μια απόφαση ταξινόμησης κινδύνου διατίθενται επαρκείς πληροφορίες. Εάν σε ελεγχόμενη ουσία μπορεί να αποδοθεί δυναμικό ερεθιστικότητας βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών, δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές. Εάν βάσει των υφιστάμενων πληροφοριών δεν είναι εφικτή η απόδοση δυναμικού ερεθιστικότητας σε ελεγχόμενη ουσία, εφαρμόζεται κλιμακωτή διαδικασία διαδοχικών ελέγχων σε ζώα έως ότου καταστεί εφικτή η βέβαιη ταξινόμηση της ουσίας.

**Επικυρωμένη μέθοδος δοκιμών:** μέθοδος δοκιμών για την οποία έχουν ολοκληρωθεί μελέτες επικύρωσης προκειμένου να προσδιοριστούν η καταλληλότητα (συμπεριλαμβανομένης της ορθότητας) και η αξιοπιστία της για συγκεκριμένο σκοπό. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ορθότητα και η αξιοπιστία επικυρωμένης μεθόδου δοκιμών ενδέχεται να μην επαρκούν για την αποδοχή της για τον προτεινόμενο σκοπό.

**Βάρος της απόδειξης:** η διαδικασία εξέτασης των πλεονεκτημάτων και των αδυναμιών διαφόρων πληροφοριών για τη συναγωγή και την τεκμηρίωση συμπεράσματος σχετικά με την επικινδυνότητα μιας ουσίας.



## Προσάρτημα 2

## ΟΥΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ICE

Πριν από την ένταξη μιας μεθόδου δοκιμών που συμφωνεί με την παρούσα κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών στην καθημερινή πρακτική, τα εργαστήρια ενδέχεται να επιθυμούν να αποδείξουν την τεχνική τους ικανότητα προσδιορίζοντας ορθά την ταξινόμηση της διαβρωτικότητας των 10 συνιστώμενων στον πίνακα 1 ουσιών για τους οφθαλμούς. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικές του φάσματος αποκρίσεων για τοπικό ερεθισμό ή διάβρωση των οφθαλμών, το οποίο βασίζεται στα αποτελέσματα της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (TG 405) (κατηγορίες 1, 2A, 2B ή χωρίς ταξινόμηση και επισήμανση σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3)(7)). Λαμβανομένης, ωστόσο, υπόψη της επικυρωμένης σκοπιμότητας των δοκιμασιών αυτών (δηλ. μόνο για τον χαρακτηρισμό διαβρωτικών/ισχυρών ερεθιστικών των οφθαλμών), η ικανότητα αποδεικνύεται μόνο με δύο αποτελέσματα δοκιμών για ταξινόμηση (διαβρωτικό/ισχυρό ερεθιστικό ή μη διαβρωτικό/μη ισχυρό ερεθιστικό). Άλλα κριτήρια επιλογής αφορούσαν τη διαθεσιμότητα των ουσιών στο εμπόριο και την ύπαρξη υψηλής ποιότητας δεδομένων αναφοράς *in vivo*, καθώς και δεδομένων υψηλής ποιότητας από τις δύο μεθόδους *in vitro* για τις οποίες καταρτίζονται κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών. Για τον λόγο αυτό, οι ερεθιστικές ουσίες επιλέχθηκαν από τον συνιστώμενο από την ICCVAM κατάλογο 122 ουσιών αναφοράς για την επικύρωση μεθόδων δοκιμών οφθαλμικής τοξικότητας *in vitro* (βλ. Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances/Προσάρτημα Η: Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς της ICCVAM) (4). Τα δεδομένα αναφοράς διατίθενται στα Background Review Documents (έγγραφα επισκόπησης των διαθέσιμων δεδομένων) της ICCVAM για τη μέθοδο δοκιμών αδιαφάνειας και διαπερατότητας του κερατοειδούς στα βοοειδή (BCOP) και τη μέθοδο δοκιμών ICE (18) (19).

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες για την απόδειξη της τεχνικής ικανότητας ως προς τη δοκιμή ICE

Χημική ουσία	CASRN	Χημική κατηγορία (1)	Φυσική μορφή	Ταξινόμηση <i>In Vivo</i> (2)	Ταξινόμηση <i>In Vitro</i> (3)
Χλωριούχο βενζαλκόλιο (5 %)	8001-54-5	Κατιονική ένωση	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Χλωρεξιδίνη	55-56-1	Αμίνη, αμιδίνη	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
L-τρυγικό διβενζούλιο	2743-38-6	Εστέρας καρβοξυλικού οξέος	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Ιμιδαζόλιο	288-32-4	Ετεροκυκλική ένωση	Στερεό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
Τριχλωροξικό οξύ (30 %)	76-03-9	Καρβοξυλικό οξύ	Υγρό	Κατηγορία 1	Διαβρωτικό/Ισχυρό ερεθιστικό
2,6-διχλωροβενζοϋλοχλωρίδιο	4659-45-4	Ακυλαλογονίδιο	Υγρό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
2-μεθυλακετοξικό αιθύλιο	609-14-3	Κετονεστέρας	Υγρό	Κατηγορία 2B	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Νιτρικό αμμώνιο	6484-52-2	Ανόργανο άλας	Στερεό	Κατηγορία 2A	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
Γλυκερίνη	56-81-5	Αλκοόλη	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό
n-εξάνιο	110-54-3	Υδρογονάνθρακας (άκυκλος)	Υγρό	Χωρίς επισήμανση	Μη διαβρωτικό/Μη ισχυρό ερεθιστικό

Συντμήσεις: CASRN = Αριθμός Μητρώου της Chemical Abstracts Service

(1) Κάθε ελεγχόμενη ουσία κατατάχθηκε σε χημική κατηγορία σύμφωνα με τυποποιημένο σύστημα ταξινόμησης, βάσει του συστήματος ταξινόμησης Medical Subject Headings (MeSH) της National Library of Medicine (θεματικές επικεφαλίδες ιατρικού περιεχομένου της Εθνικής Ιατρικής Βιβλιοθήκης, διατίθεται στον δικτυακό τόπο <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(2) Βάσει των αποτελεσμάτων της οφθαλμικής δοκιμής *in vivo* σε κουνέλια (OECD TG 405) και σύμφωνα με το GHS των Ηνωμένων Εθνών (3)(7).

(3) Βάσει των αποτελεσμάτων των μεθόδων δοκιμών BCOP και ICE.

## Προσάρτημα 3

## Διαγράμματα συσκευής υπέρτηξης και σφιγκτήρα οφθαλμών

(βλ. Burton et al. (17) για περαιτέρω γενική περιγραφή της συσκευής υπέρτηξης και του σφιγκτήρα οφθαλμών)

