

ESB-STOFNANIR

FRAMKVÆMDASTJÓRNIN

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) nr. 1152/2010

2013/EES/46/01

frá 8. desember 2010

um breytingu á reglugerð ráðsins (EB) nr. 440/2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) í því skyni að laga hana að tækniframförum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB⁽¹⁾, einkum 3. mgr. 13. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008⁽²⁾ er að finna þær prófunaraðferðir sem skal beitt í þeim tilgangi að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif efna að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006.
- 2) Nauðsynlegt er að uppfæra reglugerð (EB) nr. 440/2008 með megináherslu á að bæta við tveimur nýjum aðferðum til prófunar í glasi á augneringu sem Efnahags- og framfarastofnunin hefur nýlega samþykkt til að fækka

dýrum sem eru notuð í tilraunaskyni í samræmi við tilskipun ráðsins 86/609/EBE frá 24. nóvember 1986 um samræmingu á ákvæðum í lögum og stjórnsýslufyrirmælum aðildarríkjanna um verndun dýra sem notuð eru í tilrauna- og vísindaskyni⁽³⁾. Haft var samráð við hagsmunaaðila um þessi drög.

- 3) Því ber að breyta reglugerð (EB) nr. 440/2008 til samræmis við það.
- 4) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 133. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Köflum B.47 og B.48 er bætt við B hluta viðaukans við reglugerð (EB) nr. 440/2008 eins og fram kemur í viðaukanum við þessa reglugerð.

2. gr.

Reglugerð þessi öðlast gildi á þriðja degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 8. desember 2010.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

José Manuel BARROSO

forseti.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 324, 9.12.2010, bls. 13. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 13/2012 frá 10. febrúar 2012 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 34, 21.6.2012, bls. 24.

(1) Stjtið. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.

(2) Stjtið. ESB L 142, 31.5.2008, bls. 1.

(3) Stjtið. EB L 358, 18.12.1986, bls. 1.

VIÐAUKI

„B.47. BCOP-PRÓFUNARAÐFERÐIN (AÐFERÐ TIL PRÓFUNAR Á ÓGAGNSÆI OG GEGNDRÆPI GLÆRU ÚR NAUTGRIP (E. BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY (BCOP) TEST METHOD) TIL GREININGAR Á EFNUM SEM ERU ÆTANDI OG MJÖG ERTANDI FYRIR AUGU

INNGANGUR

1. BCOP-prófunaraðferðin er aðferð til prófunar í glasi sem hægt er að nota, við tiltekna aðstæður og með tilteknum takmörkunum, til að flokka efni og blöndur sem ætandi og mjög ertandi fyrir augu (1., 2. og 3. heimild). Í þessari prófunaraðferð eru mjög ertandi efni skilgreind sem efni sem kalla fram augnskemmdir sem eru viðvarandi hjá kaninum í a.m.k. 21 dag eftir að efnið er borið á. Þótt BCOP-prófunaraðferðin sé ekki talin gild sem heildarvalkostur í stað augnprófunar í lífi á kaninum er hún ráðlögð sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun vegna lögbundinnar flokkunar og merkingar innan tiltekna notkunarviðs (4. og 5. heimild). Prófunarefni og -blöndur (6. heimild) má flokka sem augnættandi eða mjög ertandi án þess að gera frekari prófanir á kaninum. Efni, sem reynist neikvætt í prófun, þarf að prófa á kaninum eftir raðprófunaráætlun eins og tilgreint er í OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir (7. heimild) (kafla B.5 í þessum viðauka).
2. Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðunum sem eru notaðar til að meta mátt prófunarefnisins til ætandi eða mjög ertandi áhrifa á augu með mælingu á getu þess til að kalla fram ógagnsæi og aukid gegndræpi í einangraðri glæru úr nautgrip. Eiturhrif á glæruna eru mæld með: i) skertri gegnumferð ljóss (ógagnsæi) og ii) aukinni gegnumferð natríumflúorskínslitar (gegndræpi). Mat á ógagnsæi og mat á gegndræpi glærunnar eftir váhrif frá prófunarefni eru sameinuð til að fá fram ertingarstig í glasi (e. In Vitro Irritancy Score (IVIS)) sem eru notuð til að flokka ertingarstig prófunarefnisins.
3. Augnertandi efni, sem kalla fram vefjaskemmdir sem ganga til baka á innan við 21 degi, og efni sem eru ekki ertandi hafa einnig verið prófuð með BCOP-prófunaraðferðinni. Nákvæmni og áreiðanleiki BCOP-prófunaraðferðarinnar hafa þó ekki verið formlega metin fyrir efni í þessum undirflokkum.
4. Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

ATRÍÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

5. Þessi prófunaraðferð er byggð á aðferðarlýsingu fyrir BCOP-prófunaraðferðina, frá samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða (e. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)) (8. heimild), sem var þróuð í kjölfar alþjóðlegrar fullgildingarrannsóknar (4., 5. og 9. heimild), með tillagi frá Evrópumíðstöð um fullgildingu staðgönguáðferða (e. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)) og miðstöð Japans fyrir fullgildingu staðgönguáðferða (e. the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)). Aðferðarlýsingin er byggð á upplýsingum frá Stofnuninni um rannsóknir í glasi (e. Institute for In Vitro Sciences (IIVS)) og 124. aðferðarlýsingu INVITTOX (10. heimild) sem er aðferðarlýsingin sem var notuð í forfullgildingarrannsókninni á BCOP-greiningunni sem Evrópubandalagið styrkti og var gerð 1997–1998. Báðar þessar aðferðarlýsingar eru byggðar á aðferðafræði fyrir BCOP-greiningu sem Gautheron et al. voru fyrstir til að lýsa. (11).
6. Tilgreindar takmarkanir fyrir þessa prófunaraðferð byggjast á háu hlutfalli falsjávæðra niðurstaðna fyrir alkóhól og ketón og háu hlutfalli falsneikvæðra niðurstaðna fyrir föst efni sem eru skráð í fullgildingargagnabankann (sjá 44. mgr.) (5. heimild). Ef efni í þessum efnafræðilegu og eðlisfræðilegu flokkum eru ekki höfð í gagnasafninu bætir það umtalsvert áreiðanleika BCOP-prófunarinnar í öllum flokkunarkerfum ESB (Evrópusambandsins), EPA (Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna) og HSK (hnattsamræmda kerfisins (e. GHS)) (5. heimild). Miðað við tilgang þessarar greiningar (þ.e. að greina aðeins efni sem eru augnættandi eða mjög augnertandi) er hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna ekki mikilvægt þar eð slík efni myndu því næst verða prófuð á kaninum eða, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, með öðrum tilhlýðilega fullgiltum prófunum í glasi þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga. Auk þess gerði núverandi fullgildingargagnabanki ekki kleift að meta suma flokka iðefna eða vöruflokka (t.d. blöndur) á fullnægjandi hátt. Rannsakendur geta þó ihugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir allar gerðir prófunarefna (þ.m.t. blöndur) og samþykka að jákvæð niðurstaða sé vísbending um ætandi eða mjög ertandi svör. Þó skal túlka jákvæðar niðurstöður, sem eru fengnar með alkóhólum eða ketónum, með varúð vegna áhættunnar á ofutlun (e. over-prediction).
7. Allar aðferðir, þar sem notuð eru augu úr nautgripum og glæur úr nautgripum, skulu fylgja gildandi reglum og verklagi prófunarstöðvarinnar fyrir meðhöndlun á efnum sem eru unnin úr dýrum, þ.m.t., en ekki takmarkað við, vefjum og vefjavökvum. Mælt er til að notaðar séu alþjóðlegar varúðarráðstafanir fyrir rannsóknarstofur (12. heimild).
8. Þær takmarkanir eru á prófunaraðferðinni að hún tekur ekki til tárur- eða lituskaða þrátt fyrir að í henni sé tekið tillit til einhverra af áhrifunum á augu, sem eru metin með aðferðinni til prófunar á augnertingu hjá kaninum, og til alvarleika þeirra að einhverju marki. Þótt ekki sé heldur hægt að meta með BCOP-greiningu sem slíki hvort vefjaskemmdir í augum gangi til baka þá hefur verið lagt til, á grundvelli rannsókna á kaninuauugum, að nota megi mat á upphafsdýpt glæruskaða til að greina á milli áhrifa, sem ganga ekki til baka, og þeirra sem ganga til baka (13. heimild). Að lokum gefur BCOP-prófunaraðferðin ekki færi á mati á möguleikanum á altækum eiturhrifum sem tengjast váhrifum á augu.

9. Verið er að reyna að lýsa enn frekar gagnsemi og takmörkunum BCOP-greiningar að því er varðar sanngreiningu efna, sem eru ekki mjög ertandi, og efna sem eru ekki ertandi (sjá einnig 45. mgr.). Notendur eru einnig hvattir til að láta fullgildingarstofnunum í té sýnishorn og/eða gögn fyrir formlegt mat á hugsanlegum notum BCOP-prófunaraðferðarinnar í framtíðinni, þ.m.t. til að sanngreina efni, sem eru ekki mjög ertandi, og efni sem eru ekki ertandi.
10. Sérhver rannsóknarstofa, sem gerir þessa greiningu í fyrsta sinn, skal nota hæfnisíðefnin (e. proficiency chemical) sem kveðið er á um í 2. viðbæti. Rannsóknarstofu er heimilt að nota þessi efni til að sýna fram á tæknilega færni sína við beitingu BCOP-prófunaraðferðarinnar áður en hún leggur inn gögn, fengin með BCOP-greiningu, vegna lögbundinnar flokkunar í hættuflokka.

MEGINREGLUR PRÓFUNARINNAR

11. BCOP-prófunaraðferðin er líffærslíkan í glasi sem viðheldur í stuttan tíma eðlilegri lífeðlisfræðilegri og lífefnafræðilegri virkni glæru úr nautgrip. Með þessari prófunaraðferð eru skemmdir af völdum prófunarefnisins metnar með meginlegum mælingum á breytingum á ógagnsæi og gegndræpi glærunnar með ljósdeyfnimæli og litrófsmæli fyrir sýnilegt ljós eftir því sem við á. Báðar mælingarnar eru notaðar til að reikna út ertingarstig í glasi sem eru notuð við flokkun í glasi í hættuundirflokk (e. hazard category) fyrir ertingu til að spá fyrir um augnertingarmátt prófunarefnis í lífi (sjá „Viðmiðanir fyrir ákvarðanir“).
12. Í BCOP-prófunaraðferðinni eru notaðar einangraðar glæur úr augum nýslátraðra nautgripa. Ógagnsæi glæru er mælt sem það magn ljóss sem fer í gegnum hana. Gegndræpi er mælt meginlega sem það magn natríumflúorskinslitar sem fer gegnum alla þykkt glærunnar og mælist í ætinu í aftara hólfinu. Prófunarefnið er borið á yfirborð glæruþekjunnar með því að bæta því í fremra hólfi glæruhaldarans. Í 3. viðbæti er lýsing á glæruhaldara, sem er notaður í BCOP-prófunaraðferðinni, og skýringarmynd af honum. Hægt er að kaupa glæruhaldara frá mismunandi aðilum eða smíða hann.

Uppruni og aldur augna úr nautgripum og val á dýrategundum

13. Nautgripum, sem eru sendir í sláturhús, er oftast slátrað til manneldis eða annarra nota í viðskiptalegum tilgangi. Uppruni glæra, sem eru notaðar í BCOP-prófunaraðferðinni, er eingöngu heilbrigð dýr sem eru talin hæf til að fara inn í matvælaferlið. Þar eð þyngd nautgripa liggur á breiðu bili og fer eftir búfjárkyni, aldri og kyni er ekki ráðlögð ákveðin þyngd á dýrinu við slátrun.
14. Ef notuð eru augu úr misgömlum dýrum getur það haft í för með sér breytileika í stærðarmáli glæra. Glæur, sem eru > 30,5 mm að láréttu þvermáli og $\geq 1100 \mu\text{m}$ að þykkt í miðri glæru, fást yfirleitt úr nautgripum sem eru eldri en 8 ára en glæur, sem eru < 28,5 mm að láréttu þvermáli og < 900 μm að þykkt í miðri glæru, fást yfirleitt úr nautgripum sem hafa ekki náð 5 ára aldri (14. heimild). Af þessum sökum eru að jafnaði ekki notuð augu úr nautgripum sem eru eldri en 60 mánaða. Ekki er venja að nota augu úr gripum sem hafa ekki náð 12 mánaða aldri þar eð augun eru þá enn að þroskast og þykkt og þvermál glærunnar umtalsvert minna en gefið er upp fyrir fullorðna nautgripi. Þó er leyfilegt að nota glæru úr ungum dýrum (þ.e. 6–12 mánaða) þar eð henni fylgja nokkrir kostir, s.s. aukið framboð, þröngt aldursbil og minni hætta á hugsanlegum kúariðuváhrifum á starfsfólk (15. heimild). Þar eð gagnlegt væri að meta betur áhrif stærðar eða þykktar glæru á svörun við ætandi og ertandi efnum eru notendur hvattir til að gefa upp áætlaðan aldur og/eða þyngd dýranna sem glærunnar, sem eru notaðar í rannsókn, eru teknar úr.

Söfnun og flutningur augna til rannsóknarstofunnar

15. Starfsfólk sláturhúsa tekur augun. Augun skulu numin brott (e. enucleated) eins fljótt og hægt er eftir dauða dýrsins til að lágmarka vélrænan skaða og annan skaða á þeim. Til að koma í veg fyrir að augun komist í snertingu við efni sem eru hugsanlega ertandi skal starfsfólk sláturhússins ekki nota þvotta- og hreinsiefni við skolun á höfði dýrsins.
16. Augun skulu lögð í jafnaða saltlausn samkvæmt Hank (e. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)) í hæfilega stóru ílát, svo að fljóti alveg yfir þau, og flutt á rannsóknarstofuna á þann hátt að skemmdir og/eða bakteríusmit verði í lágmarki. Þar eð augun eru tekin meðan á slátrun stendur geta þau komist í snertingu við blóð og önnur líffræðileg efni, þ.m.t. bakteríur og aðrar örverur. Það er því mikilvægt að tryggja að áhætta á mengun sé í lágmarki (t.d. með því að geyma ílát með augunum á blautum ís og með því að bæta sýkladrepandi efnum í saltlöginn sem augun eru geymd í meðan á flutningi stendur, t.d. penisillíni í styrknum 100 IU/ml og streptómýsini í styrknum 100 $\mu\text{g/ml}$).
17. Tímabilið milli töku augnanna og notkunar glærunna samkvæmt BCOP-prófunaraðferðinni skal vera sem styst (að jafnaði skulu þau notuð sama dag og þau eru tekin) og skal sýnt fram á að lengd þess spili ekki niðurstöðum rannsóknarinnar. Þær niðurstöður eru byggðar á valviðmiðunum fyrir augun sem og jákvæðum og neikvæðum svörum úr samanburðarprófunum. Öll augu, sem eru notuð í greiningunni, skulu vera úr sama samsafni augna, teknu á tilteknum degi.

Valviðmiðanir fyrir augu sem eru notuð í BCOP-prófunaraðferðinni

18. Þegar komið er með augun á rannsóknarstofuna skal skoða vandlega hvort á þeim eru gallar, þ.m.t. ógagnsæi, rispur og nýæðun (e. neovascularisation). Aðeins skal nota glæur úr augum sem eru laus við slíka galla.
19. Gæði hvernar glæru eru einnig metin á síðari stigum greiningarinnar. Farga skal glærum sem eru ógagnsærri en sem nemur sjö ógagnsæiseiningum eftir einnar klukkustundar jafnvægistíma (ATH.: ljósdeyfnimælirinn skal kvarðaður með ógagnsæisstöðlum sem eru notaðir til að ákvarða ógagnsæiseiningarnar, sjá 3. viðbæti).
20. Hver meðferðarhópur (prófunarefni og samskeiða jákvæður og neikvæður samanburður) samanstandur af minnst þremur augum. Nota skal þrjár glæur sem neikvæðar samanburðarglæur í BCOP-greiningunni. Þar eð allar glæur eru skornar brott úr heilu auga og komið fyrir í glæruhólfnum er hugsanlegt að skemmd eftir meðhöndlun hafi áhrif á ógagnsæis- og gegndræpisgildi hvernar glæru (að neikvæða samanburðinum meðtöldum). Auk þess eru ógagnsæis- og gegndræpisgildi neikvæðu samanburðarglærunna notuð til að leiðrétta ógagnsæis- og gegndræpisgildi prófuðu glærunna og jákvæða samanburðarins við útreikning á ertingarstigi í glasi.

VINNUAÐFERÐ**Undirbúningur augnanna**

21. Gallalausar glæur eru skornar úr með 2–3 mm brún af hvítunni áhangandi til að auðvelda meðhöndlunina, sem á eftir kemur, og þess gætt að skadda ekki glæruþekjuna og -innþekjuna. Einangruðum glærum er komið fyrir í sérhönnuðum glæruhöldurum sem samanstanda af fremri og aftari hólfum, það fremra með skilfleti við glæruþekjuna og það aftara við innþekju hennar. Bæði hólfín eru fyllt algerlega með forhituðu lágmarksæti Eagles (e. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)) (aftara hólfíð á undan) og tryggt að ekki myndist neinar loftbólur. Búnaðurinn er síðan jafnvægisstilltur við 32 ± 1 °C í a. m. k. eina klukkustund til að glæurnar jafnvægisstillist við ætið og til að í þeim náist eðlileg efnaskiptavirkni, að því marki sem unnt er (hitastig yfirborðs glærunnar í lífi er u.þ.b. 32 °C).
22. Þegar jafnvægisstillgartímabilinu lýkur er nýju EMEM-æti bætt í bæði hólfín og gerðar grunnviðmiðunarmælingar á ógagnsæi fyrir hverja glæru. Öllum glærum með stórsæjar vefjaskemmdir (t.d. rispur, litun, nýæðun) eða ógagnsæi, sem er > 7 ógagnsæiseiningar, er fargað. Meðalógagnsæi allra jafnvægisstilltu glærunna er reiknað út. Minnst þrjár glæur, með ógagnsæisgildi sem eru nærri meðalgildinu fyrir allar glæur, eru valdar sem glæur í neikvæðan samanburð (eða samanburð með leysi). Þeim glærum, sem eftir eru, er þá skipt í meðferðarhópa og jákvæða samanburðarhópa.
23. Varmarýmd vatns er meiri en lofts og hitaskilyrði í vatni því stöðugri á stöðutímanum (e. incubation). Því er mælt með því að nota vatnsbað til að halda glæruhalðaranum og innihaldi hans við 32 ± 1 °C. Þó ert hægt að nota loftþitakassa (e. air incubator) ef þess er gætt að viðhalda stöðugleika hitastigsins (t.d. með því að forhita halðarann og ætið).

Prófunarefnið borið á

24. Notaðar eru tvær mismunandi aðferðarlýsingar, önnur fyrir vökva og yfirborðsvirk efni (föst eða fljótandi) og hin fyrir óyfirborðsvirk efni.
25. Vökvar eru prófaðir óþynntir en yfirborðsvirk efni eru prófuð við styrkinn 10% (massi/rúmmál) í 0,9% natríumklóríðlausn, eimuðu vatni eða öðrum leysi sem hefur verið sýnt fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið. Hálföst efni, krem og vax eru oftast prófuð sem vökvar. Ef annar þynningarstyrkur er notaður skal það rökstutt. Glæurnar eru látnar verða fyrir váhrifum frá vökvum og yfirborðsvirkum efnunum í 10 mínútur. Ef aðrir váhrifatimar eru notaðir skal það stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum.
26. Óyfirborðsvirk, föst efni eru að jafnaði prófuð sem lausnir eða sviflausnir í 20% styrk í 0,9% natríumklóríðlausn, eimuðu vatni eða öðrum leysi sem sýnt hefur verið fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið. Við ákveðnar aðstæður og með nægum vísindalegum rökum er einnig heimilt að prófa föst efni í hreinu formi með því að bera þau beint á yfirborð glærunnar með aðferðinni með opnu hólfí (sjá 29. mgr.) Glæur eru látnar verða fyrir váhrifum frá föstum efnunum í fjórar klukkustundir en heimilt er, eins og með vökvum og yfirborðsvirkum efnunum, að nota aðra váhrifatíma ef það er stutt fullnægjandi vísindalegum rökum.
27. Hægt er að nota aðrar aðferðir við meðhöndlun prófunarefnisins sem fara eftir eðlisfræðilegum og efnafræðilegum eiginleikum þess (t.d. föst efni, vökvar, seigfljótandi vökvar eða vökvar sem eru ekki seigfljótandi). Mikilvægasti þátturinn er að tryggja að prófunarefnið þeki yfirborð þekjunnar nægilega vel og að það sé fjarlægð nægilega vel á skolonarstiginu. Að jafnaði er notuð aðferð með lokuðu hólfí fyrir prófunarefni sem eru ekki seigfljótandi eða lítið eitt seigfljótandi en aðferð með opnu hólfí fyrir prófunarefni sem eru hálfseigfljótandi og seigfljótandi og fyrir föst efni í hreinu formi.

28. Í aðferðinni með lokuðu hólfu er nóg af prófunarefni (750 µl) til að þekja þekjuhlið glærunnar sett í fremra hólflið gegnum skammtagötin ofan á hólfinu og þeim síðan lokað með hólfatöppunum meðan á váhrifum stendur. Það er mikilvægt að tryggja að hver glæra sé látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í hæfilega langan tíma.
29. Í aðferðinni með opnu hólfu eru hringlaga þéttið og glerglugginn fjarlægð af fremra hólfinu fyrir meðhöndlunina. Samanburðar- eða prófunarefnið (750 µl, eða nóg af prófunarefni til að þekja glæruna alveg) er borið beint á yfirborð glæruþekjunnar með örpípettu. Ef erfitt er að pípla prófunarefni má setja prófunarefnið undir þrýstingi í ruðningspípettu til hagræðis við skömmtunina. Oddi ruðningspípettunnar er stungið inn í skömmtunarenda sprautunnar svo að hægt sé að setja efnið inn í ruðningspípettuna með þrýstingi. Um leið og pípettubullar er dregin upp er þrýst á bulluna í sprautunni. Ef loftbólur koma í ljós í oddi pípettunnar er prófunarefnið fjarlægð (því þrýst út) og ferlið endurtekið þar til oddurinn er fylltur og án lofbóla. Ef það er nauðsynlegt er hægt að nota venjulega sprautu (án nálar) þar eð hún gerir kleift að mæla nákvæmlega rúmmál prófunarefnisins og auðveldara verður að bera það á yfirborð glæruþekjunnar. Eftir skömmtunina er glugginn aftur settur á sinn stað á fremra hólfinu til að endurskapa lokað kerfi.

Stöðutími eftir váhrif

30. Eftir váhrifatímabilið er prófunarefnið, neikvæði samanburðurinn eða jákvæði samanburðurinn fjarlægður úr fremra hólfinu og þekjan þvegin minnst þrisvar sinnum (eða þar til ekki er hægt að sjá nein merki um prófunarefnið) með EMEM-æti (sem inniheldur fenólrauðan litvísí). Æti með fenólrauðum litvísí er notað til skolonar þar eð unnt er, með því að vakta breytingar á fenólrauða litvísinum, að ákvarða hversu vel tekst að skola burt súrum eða basískum efnum. Glærunar eru þvegnar oftar en þrisvar sinnum ef fenólrauði litvísirinn er enn mislitur (gulur eða purpurarauður) eða ef prófunarefnið er enn sýnilegt. Þegar ætið er laust við prófunarefni eru glærunar skolaðar einu sinni að lokum með EMEM-æti (án fenólrauðs litvísís). EMEM-ætið (án fenólrauðs litvísís) er notað til lokaskolonar til að tryggja að fenólrauði litvísirinn hafi verið fjarlægður úr fremra hólfinu fyrir mælinguna á ógagnsæi. Þá er fremra hólflið fyllt aftur með nýju EMEM-æti án fenólrauðs litvísís.
31. Við prófun á vökvum og yfirborðsvirkum efnum eru glærunar látnar standa (e. incubated) eftir skolon við 32 ± 1 °C í tvær klukkustundir til viðbótar. Við tiltekna aðstæður getur verið gagnlegt að lengja eftirváhrifatímamann og er hægt að meta það í hverju tilviki fyrir sig. Glæsur, sem eru meðhöndlaðar með föstum efnum, eru skolaðar vandlega við lok fjögurra klukkustunda váhrifatímans en þurfa ekki frekari stöðutíma.
32. Við lok stöðutímans eftir váhrifatímamann, þegar um er að ræða vökva og yfirborðsvirk efni, og við lok fjögurra tíma váhrifatímans, þegar um er að ræða óyfirborðsvirk, föst efni, eru ógagnsæi og gegndræpi hverrar glæru skráð. Auk þess er hver glæra athuguð sjónrænt og viðeigandi athugasemdir skráðar (t.d. flögnun vefja, leifar prófunarefnis, óeinsleit ógagnsæismynstur). Þessar athuganir geta verið mikilvægar þar eð þær kunna að endurspeglast í breytileika í ljósdeyfnimælingunum.

Samanburðarefni

33. Í hverri tilraun er samskeiða, neikvæður samanburður eða samanburður með leysi eða burðarefni, og jákvæður samanburður.
34. Þegar fljótandi efni er prófað óþynnt er samskeiða, neikvæður samanburður (t.d. 0,9% natríumklóríðlausn eða eimað vatn) hafður með í BCOP-prófunaraðferðinni til þess að hægt sé að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að gefa grunnviðmiðun fyrir endapunkta rannsóknarinnar. Það tryggir einnig að greiningarskilyrðin leiði ekki af sér óæskilega ertingarsvörun.
35. Þegar þynnt, fljótandi efni, yfirborðsvirkt efni eða fast efni er prófað er samskeiða samanburðarhópur með leysi eða burðarefni hafður með í BCOP-prófunaraðferðinni til þess að hægt sé að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að gefa grunnviðmiðun fyrir endapunkta greiningarinnar. Aðeins má nota leysi eða burðarefni sem sýnt hefur verið fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið.
36. Þekkt, augnertandi efni er haft með í hverri tilraun sem samskeiða, jákvæður samanburður til að sannreyna að fram komi viðeigandi svörun. Þar eð BCOP-greiningin er notuð í þessari prófunaraðferð til að greina ætandi eða mjög ertandi efni er æskilegt að jákvæði samanburðurinn sé viðmiðunarefni sem framkallar kröftuga svörun með þessari prófunaraðferð. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal ertingarsvörunin þó ekki vera of kröftug.
37. Dæmi um jákvæðan samanburð fyrir fljótandi prófunarefni eru dímetýlformamið eða 1% natríumhýdroxíð. Dæmi um jákvæðan samanburð fyrir föst prófunarefni er 20% (þyngd á móti rúmmáli) imidasól í 0,9% natríumklóríðlausn.

38. Viðmiðunarefni (e. benchmark substance) eru gagnleg til að meta augneringarmátt óþekktra iðefna í tilgreindum iðefna- eða vöruflokki eða til að meta hlutfallslegan ertingarmátt augnertandi efnis á tilteknu ertingarsvörundarsviði.

Endapunktur mældir

39. Ógagnsæi er ákvarðað út frá því magni ljóss sem fer í gegnum glærana. Ógagnsæi glæru er mælt meginlega með ljósdeyfningu sem gefur ógagnsæisgildi, mæld á samfelldum kvarða.
40. Gegndræpi er ákvarðað með hliðsjón af magni natríumflúrskinslitar sem flæðir gegnum öll frumulög glærunnar (þ.e. þekjuna á ytra yfirborði glærunnar og gegnum innþekjuna á innra yfirborði hennar). 1 ml af natríumflúrskinslausn (4 eða 5 mg/ml, ef prófaðir eru, annars vegar, vökvar og yfirborðsvirk efni eða, hins vegar, óyfirborðsvirk, föst efni sem eru ekki yfirborðsvirk) er bætt í fremra hólf glæruhaldarans, sem hefur skilflöt við þekjuhlið glærunnar, en fremra hólf, sem hefur skilflöt við innþekjuhlið glærunnar, er fyllt af nýju EMEM-æti. Því næst er glæran í haldaranum látin standa í láréttri stöðu í 90 ± 5 mín. við 32 ± 1 °C. Magn natríumflúrskins, sem flæðir inn í aftara hólf, er mælt meginlega með litrófsmælingu í útfjólubláu eða sýnilegu ljósi (e. UV/VIS spectrophotometry). Litrófsmælingar, metnar við 490 nm, eru skráðar sem ljóspéttigildi (OD490) eða gleypnigildi sem eru mæld á samfelldum kvarða. Gegndræpisgildi flúrskinslausnarinnar eru ákvörðuð með því að nota OD490-gildi sem eru byggð á litrófsmæli fyrir sýnilegt ljós með 1 cm staðlaða ljósmælilengd.
41. Einnig er hægt að nota lesara fyrir 96 hola örtitrarbakka, að því tilskildu að i) hægt sé að fastsetja línulegt svið bakkalesarans við ákvörðun á OD490-gildum flúrskinslausnar og ii) notað sé rétt rúmmál flúrskinslausnarsýna í 96 holu bakkannum svo að OD490-gildin sem fást jafngildi 1 cm stöðluðu ljósmælilengdinni (til þess gæti þurft fleytifulla holu, oftast um 360 ml).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

42. Þegar búið er að leiðrétta ógagnsæisgildi og meðalgildi gegndræpis (OD490) fyrir bakgrunnsgagnsæisgildi og OD490-gegndræpisgildi neikvæða samanburðarins skal sameina meðalgildi ógagnsæis og meðalgildi OD490-gegndræpis fyrir hvern meðferðarhóp í reynsluformúlu til að reikna ertingarstig í glasi fyrir hvern meðferðarhóp sem hér segir:

$$\text{Ertingarstig í glasi} = \text{meðalgildi ógagnsæis} + (15 \times \text{meðalgildi OD490-gegndræpis})$$

Sina et al. (16. heimild) skýrðu frá því að þessi formúla hefði verið leidd út meðan á innanhúss- og fjölsetrarannsóknnum stóð. Gögn, sem fengin voru fram í rannsókn margra rannsóknarstofa á röð 36 efnasambanda, voru sett í fjölbreytugreiningu til að finna þá formúlu sem fellur best að bæði gögnunum í lífi og í glasi. Vísindamenn tveggja mismunandi fyrirtækja gerðu þessa greiningu og leiddu út nánast eins jöfnur.

43. Einnig skal meta ógagnsæis- og gegndræpisgildi óháð hvort öðru til að ákvarða hvort prófunarefni kallar fram ættingu eða mikla ertingu með aðeins öðrum af endapunktunum tveimur (sjá „Viðmiðanir fyrir ákvarðanir“).

Viðmiðanir fyrir ákvarðanir

44. Efni sem kallar fram ertingarstig í glasi, sem er $\geq 55,1$, er skilgreint sem ætandi efni eða mjög ertandi efni. Ef prófunarefnið er ekki greint sem augnættandi efni eða mjög ertandi efni eins og tilgreint er í 1. mgr. skal gera frekari prófanir til flokkunar og merkingar þess. Heildarnákvæmni BCOP-prófunaraðferðarinnar er 79% (113/143) til 81% (119/147), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna 19% (20/103) til 21% (22/103) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna 16% (7/43) til 25% (10/40) þegar aðferðin er borin saman við gögn úr augnprófunaraðferð í lífi á kaninum sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfum EPA (1. heimild), ESB (2. heimild) eða HSK (3. heimild). Þegar efni í tilteknum efnaflokkum (þ.e. alkóhól, ketón) eða eðlisfræðilegum flokkum (þ.e. föst efni) eru ekki höfð í gagnasafninu er nákvæmni BCOP-prófunaraðferðarinnar innan ESB- EPA- og HSK-flokkunarkerfanna á bilinu 87% (72/83) til 92% (78/85), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna á bilinu 12% (7/58) til 16% (9/56) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna á bilinu 0% (0/27) til 12% (3/26).
45. Jafnvel þótt prófunarefni flokkist ekki sem ætandi eða mjög ertandi fyrir augu geta gögn sem fást með BCOP-prófunaraðferðinni verið gagnleg, í tengslum við prófunargögn úr augnprófun í lífi á kaninum eða úr tilhlýðilega fullgilttri prófun í glasi; við frekara mat á gagnsemi og takmörkunum BCOP-prófunaraðferðarinnar við sanngreiningu efna sem eru ekki mjög ertandi og efna sem eru ekki ertandi (verið er að þróa leiðbeiningarskjal um notkun aðferða til prófunar í glasi á augneiturhrifum).

Viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar

46. Prófun telst samþykktarhæf ef ertingarstig (IVIS) jákvæða samanburðarins er innan tveggja staðalfrávika frá núverandi rannsóknarsögulegu meðaltali en það skal uppfært a.m.k. á þriggja mánaða fresti eða í hvert sinn sem samþykktarhæf prófun er gerð í rannsóknarstofnum þar sem prófanir eru sjaldan framkvæmdar (þ.e. sjaldnar en einu sinni í mánuði). Svaranir úr neikvæða samanburðinum eða samanburðinum með leysi eða burðarefni skulu hafa lægri niðurstöðugildi ógagnsæis og gegndræpis en sem nemur fastsettu efri mörkum fyrir bakgrunsgildi ógagnsæis og gegndræpis fyrir glætur úr nautgripum sem eru meðhöndlaðar með neikvæðum samanburði eða samanburði með leysi eða burðarefni.

Prófunarskýrsla

47. Í prófunarskýrslunni skulu vera eftirfarandi upplýsingar ef þær skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar:

Prófunar- og samanburðarefni

Efnaheiti, s.s. byggingarheiti sem Upplýsingaþjónustan um íðefni (CAS) notar, og þar á eftir önnur þekkt heiti,

CAS-skráningarnúmer (CAS-nr.) ef það er þekkt.

Hreinleiki og samsetning efnisins eða blöndunnar (í hundraðshlutum miðað við þyngd) að því marki sem þær upplýsingar eru tiltækar.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, s.s. eðlisástand, rokgirni, sýrustig, stöðugleiki, efnaflokkur og vatnsleysni.

Meðhöndlun prófunarefnanna eða samanburðarefnanna fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun).

Stöðugleiki, ef hann er þekktur.

Upplýsingar um bakhjarl og prófunarstöð

Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra,

tilgreining á uppruna augnanna (þ.e. fyrirtækið þar sem þau voru tekin),

skilyrði við geymslu og flutning augnanna (t.d. dagur og stund þegar þau voru tekin, tíminn sem leið fram að því að prófun hófst, flutningslausn og hitaskilyrði, hvort notuð voru sýkladrepani efni),

tilteknir eiginleikar dýranna sem augun voru tekin úr (t.d. aldur, kyn og þyngd gjafadýrsins) ef þær upplýsingar eru tiltækar.

*Rökstuðningur fyrir vali á prófunaraðferð og aðferðarlýsingin sem er notuð**Heilleiki prófunaraðferðarinnar*

Verklagið sem er notað til að tryggja heilleika (þ.e. nákvæmni og áreiðanleika) prófunaraðferðarinnar yfir tíma (t.d. reglubundin prófun á hæfnisefnum (e. proficiency substance), notkun rannsóknarsögulegra gagna um neikvæðan og jákvæðan samanburð).

Viðmiðanir fyrir samþykktarhæfu prófun

Viðunandi svið fyrir samskeiða, jákvæðan og neikvæðan samanburð, byggð á rannsóknarsögulegum gögnum.

Viðunandi svið fyrir samskeiða viðmiðunarsamanburð, byggð á rannsóknarsögulegum gögnum, ef við á.

Prófunarskilyrði

Lýsing á prófunarkerfinu sem er notað.

Gerð hornhimnuhaldarans sem er notaður.

Kvörðunarupplýsingar fyrir búnað sem er notaður til að mæla ógagnsæi og gegndræpi (t.d. ljósdeyfnimæli og litrófsmæli).

Upplýsingar um nautgripaglærurnar sem eru notaðar, þ.m.t. yfirlýsingar um gæði þeirra.

Upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð.

Styrkgildi prófunarefnisins eða prófunarefnanna sem eru notuð.

Lýsingar á öllum breytingum á prófunarferlinu.

Tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn fyrir líkanið (t.d. neikvæðan og jákvæðan samanburð, hæfnisefni, viðmiðunarefni).

Lýsing á þeim matsviðmiðunum sem eru notaðar.

Niðurstöður

Gögn úr hverju prófunarsýni, sett upp í töflu (t.d. ógagnsæis- og OD490-gildi og útreikningur á ertingarstigum í glasi fyrir prófunarefnið og jákvæða og neikvæða samanburðinn og viðmiðunarsamanburðinn, ef haft með, í töfluformi, þ.m.t. gögn úr samhliða, endurteknum prófunum, eins og við á, og meðaltöl ± staðalfrávik fyrir hverja tilraun.

Lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu.

Umfjöllun um niðurstöðurnar:

Niðurstaða

HEIMILDIR

- 1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- 2) Reglugerð (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og þökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006. Stjtið. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1.
- 3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Aðgengilegt á:

[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. Aðgengilegt á:

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

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- 6) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB. Stjtið. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.
- 7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Aðgengilegt á:

[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. Í: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Aðgengilegt á:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm\]](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: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Aðgengilegt á:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm\]](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. Aðgengilegt á:
[\[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf\]](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. Aðgengilegt á:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](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. Aðgengilegt á:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm)

I. viðbætur

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferðar og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli rétttra niðurstaðna úr prófunaraðferð.

Viðmiðunarefni: Efni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunarefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) einsleitun og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn (e. class of substances) sem er verið að prófa, iii) þekkta eðlisfræðilega/efnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Glæra: Gagnsær, fremsti hluti augans sem þekur lithimnuna og augasteininn og hleypir ljósi inn í augað.

Ógagnsæi glæru: Mæling á því að hvaða marki glæran verður ógagnsæ eftir váhrif frá prófunarefni. Aukið ógagnsæi glæru bendir til skemmda á henni. Hægt er að meta ógagnsæi á huglægan hátt, eins og gert er með Draize-augnprófun á kaninum, eða á hlutlægan hátt með mælitæki, s.s. ljósdeyfnimæli.

Gegndræpi glæru: Megindleg mæling á skemmdum á glæruþekjunni með ákvörðun á því magni natríumflúrskinslitarins sem fer í gegnum öll frumulög glærunnar.

1. undirflokkur EPA: Ætandi áhrif (eyðing augnvefja sem gengur ekki til baka) eða áhrif á glæru eða viðvarandi erting í meira en 21 dag (1. heimild).

ESB-undirflokkur H41: Vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunarefni hefur verið borið framan á augað, sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá áburði.

Hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna: Hlutfall allra jákvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna: Hlutfall allra neikvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

HSK (hnattsamræmda kerfið til flokkunar og merkingar á iðefnum) (e. GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)): Kerfi til flokkunar iðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlissrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnadarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif iðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (3. heimild).

1. undirflokkur HSK: Vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunarefni hefur verið borið framan á augað, sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá áburði (3. heimild).

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur er látinn verða fyrir váhrifum frá því efni.

Ertingarstig í glasi (e. In Vitro Irritancy Score (IVIS)): Reynsluformúla, notuð þannig við BCOP-greiningu að meðalgildi ógagnsæis og meðalgildi gegndræpis fyrir hvern meðferðarhóp eru sameinuð í eitt stig í glasi fyrir hvern meðferðarhóp. Ertingarstig í glasi = meðalgildi ógagnsæis + (15 × meðalgildi gegndræpis).

Neikvæður samanburður: Ómeðhöndlað, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunarefni og öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn víxlverkar við prófunarkerfið.

Efni sem eru ekki ertandi: Efni sem flokkast ekki sem augnertandi í I., II. eða III. undirflokk EPA, ESB-undirflokk H41 eða H36 né HSK-undirflokk 1, 2A eða 3B.

Augnertandi efni: a) Efni sem veldur vefjaskemmdum í auga sem ganga ekki til baka, b) efni sem flokkast sem augnertandi í 1. undirflokk HSK, I. undirflokk EPA eða ESB-undirflokk H41 (1., 2. og 3. heimild).

Augnertandi efni: a) Efni sem framkallar breytingu, eftir að það er borið framan á augað, sem gengur til baka, b) efni sem flokkast sem augnertandi efni í II. eða III. undirflokk EPA, ESB-undirflokk H36 eða HSK-undirflokk 2A eða 2B (1., 2. og 3. heimild).

Mjög augnertandi efni: a) Efni sem veldur vefjaskemmdum í auganu, eftir að það er borið framan á augað, sem ganga ekki til baka innan 21 dags frá áburði, eða sem veldur alvarlegri sjónskerðingu, b) efni sem flokkast sem augnertandi efni í 1. undirflokk HSK, I. undirflokk EPA eða ESB-undirflokk H41 (1., 2. og 3. heimild).

Ljósdeyfnimælir: Tæki sem mælir ógagnsæi glæru með meginlegu mati á því ljósi sem fer í gegnum hana. Dæmigert tæki hefur tvö hólf, hvort um sig með eigin ljósgjafa og ljósnema. Annað hólf er notað undir meðhöndluðu glærana en hitt er notað til að kvarða og núllstillta tækið. Ljósi frá halógenlampa er beint gegnum samanburðarhólf (tómt hólf án glugga eða vökva) á ljósnema og það borið saman við ljósið sem beint er gegnum tilraunahólf, sem hýsir hólf með glærinni, og á ljósnema. Tækið mælir muninn á ljósmagninu sem nær til ljósnemanna og sýnir ógagnsæisgildi í tölustöfum á stafrænum skjá.

Jákvæður samanburður: Samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörin. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörin jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi mikla svörin þó ekki vera of kröftug.

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmi hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmi og fjölsetra samanburðarnákvæmi og einsetursendurtekningarnákvæmi.

Samanburður með leysi eða burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og sem er unnið samhliða sýnum, sem eru meðhöndluð með prófunarefninu, og samhliða öðrum samanburðarsýnum til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörin fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunarefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða, neikvæðu samanburðarsýni sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið vixlverkar við prófunarkerfið.

Stigskipt prófun: Prepskipt prófunaráætlun þar sem allar fyrirliggjandi upplýsingar um prófunarefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunarefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunarefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

Fullgilt prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem sætt hefur fullgildingarrannsókn til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika fyrir tiltekinn tilgang. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nákvæm og áreiðanleg til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang.

Vægi rökstuddra vísbendinga: Ferli sem felst í því að veга og meta styrkleika og veikleika ýmissa upplýsinga til að komast að niðurstöðu um hugsanlega hættu af tilteknu efni og styðja þá niðurstöðu rökum.

2. viðbætur

Hæfnisefni fyrir BCOP-prófunaraðferðina

Áður en prófunaraðferð, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar kunna rannsóknarstofur að vilja sýna fram á tæknilega hæfni með því að greina rétt augnertingarflokkun efnanna tíu sem eru ráðlögð í töflu 1. Þau efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarvið staðbundinnar ertingar eða ætingar á augum samkvæmt niðurstöðum úr augnprófun í lífi á kaninum (viðmiðunarregla 405 um prófanir (e. TG 405)) (þ.e. undirflokkum 1, 2A, 2B, eða óflokkað og merkt samkvæmt hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (HSK Sp (e. UN GHS)) (3. og 7. heimild). Með hliðsjón af fullgilttri gagnsemi þessara greininga (þ.e. að greina aðeins augnertandi efni/mjög augnertandi efni) eru það þó aðeins tvær prófunarniðurstöður sem miðast við flokkun (ærandi efni/mjög ertandi efni eða ekki ærandi efni/ekki mjög ertandi efni) sem gera kleift að sýna fram á hæfni viðkomandi rannsóknarstofu. Aðrar valviðmiðanir voru að efnin fengjust á almennum markaði, að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og að tiltæk væru hágæða gögn, fengin með aðferðunum tveimur í glasi sem verið er að þróa viðmiðunarreglur um prófanir fyrir. Af þessum sökum voru valin ertandi efni af skrá samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða yfir 122 viðmiðunarefni sem eru ráðlögð til fullgildingar á aðferðum til prófunar í glasi á augneiturhrifum (sjá viðbæti H: Ráðlögð viðmiðunarefni samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða (e. ICCVAM Recommended Reference Substances)) (5. heimild). Tilvísunargögn er að finna í bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða á BCOP-prófunaraðferðinni og ICE-prófunaraðferðinni (prófunaraðferðinni með einangruðu auga úr kjúklingi) (17. og 18. heimild).

Tafla 1

Efni sem eru ráðlögð til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir BCOP-prófunaraðferðina

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur ⁽¹⁾	Eðlisástand	Flokkun í lífi ⁽²⁾	Flokkun í glasi ⁽³⁾
Bensalkóníum-klóríð (5%)	8001-54-5	Óniumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Klórhexidín	55-56-1	Amin, amidín	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Díbensóýl-L-vínsýra	2743-38-6	Karboxýlsýra, estri	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Imidasól	288-32-4	Heturhringur	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Þríklóredíksýra (30%)	76-03-9	Karboxýlsýra	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
2,6-díklór-bensóýlklóríð	4659-45-4	Asýlhalið	Vökvi	Undirflokkur 2A	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Etýl-2-metýla-setóasetat	609-14-3	Ketón, estri	Vökvi	Undirflokkur 2B	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Ammóníum-nítrat	6484-52-2	Ólífrænt salt	Fast efni	Undirflokkur 2A	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Glýseról	56-81-5	Alkóhól	Vökvi	Ekki merkt	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
n-hexan	110-54-3	Vetniskolefni (keðjulaga)	Vökvi	Ekki merkt	Ekki ætandi eða ekki mjög ertandi efni

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni

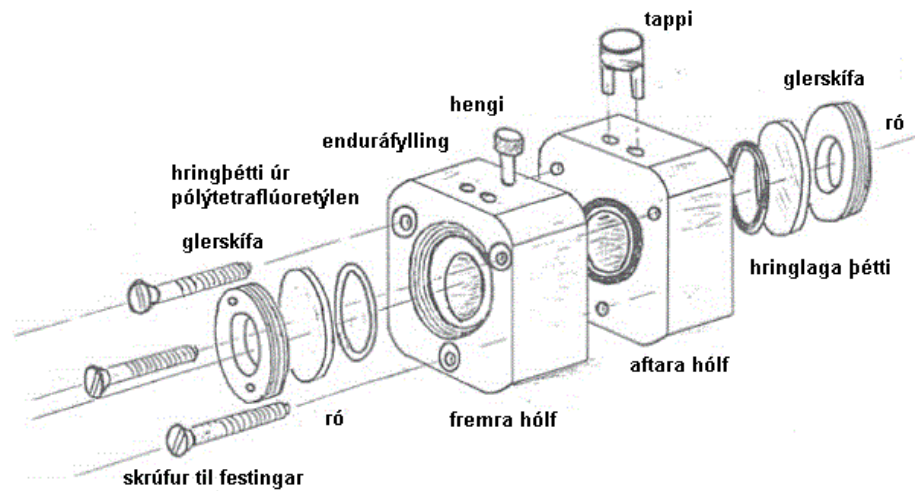
⁽¹⁾ Hverju prófunarefni var skipað í efnaflokk með því að nota staðlað flokkunarkerfi, byggt á flokkunarkerfi National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).⁽²⁾ Byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi á kanínuaugum (OECD-viðmiðunaregla 405 um prófanir) og með notkun hnattsamræms kerfis Sameinuðu þjóðanna (3. og 7. heimild).⁽³⁾ Byggt á niðurstöðum sem eru fengnar með BCOP- og ICE-prófunaraðferðunum.

3. viðbætur

GLÆRUHALDARI FYRIR BCOP-PRÓFUNARAÐFERÐINA

1. Glæruhaldarar fyrir BCOP-prófunaraðferðina eru gerðir úr hvarftregu efni (t.d. pólýprópýleni). Haldararnir samanstanda af tveimur helmingum (fremra og aftara hólf) og eru með tvö eins sívöl innri hólf. Hvort hólf tekur 5 ml að rúmmáli og er lokað með glerglugga sem ljósdeyfímælingar eru gerðar gegnum. Hvort innra hólfid er 1,7 cm í þvermál og 2,2 cm á dýpt (1). Hringlaga þétti, sem er staðsett á aftara hólfinu, er notað til að koma í veg fyrir leka. Glærunnar eru settar með innþekjuna niður á hringlaga þétti aftara hólfanna og fremri hólfín eru sett á þekjuhlið glærunna. Hólfunum er haldið á réttum stað með þremur ryðfríum skrúfum sem eru staðsettar á ytri brúnum hólfins. Á enda hvors hólfis er glergluggi sem hægt er að fjarlægja til að auðvelda aðgengi að glærunni. Annað hringþétti er einnig staðsett milli glergluggans og hólfins til að koma í veg fyrir leka. Tvö göt ofan á hvoru hólfu gera kleift að setja í og fjarlægja æti og prófunarefnasambönd. Þeim er lokað með gúmmihettum meðan á meðhöndlun og stöðutíma stendur.

⁽¹⁾ Uppgefin stærðarmál miðast við haldara sem er notaður fyrir glærunnar úr kúm sem eru á bilinu 12–60 mánaða. Ef notuð eru 6–12 mánaða gömul dýr þarf að hanna haldarann þannig að hvort hólf taki 4 ml að rúmmáli og hvort innri hólfanna sé 1,5 cm að þvermáli og 2,2 cm að dýpt. Þegar nýr glæruhaldari er hannaður er mjög mikilvægt að hlutfall yfirborðssvæðis glærunnar, sem er látin verða fyrir váhrifum, og rúmtak aftara hólfins skuli vera hið sama og hlutfall þeirra í hefðbundnum glæruhaldara. Þetta er nauðsynlegt til að tryggja rétta ákvörðun gegndræpisgilda fyrir útreikninginn á ertingarstigi í glasi með tillagðri formúlu.



Orðalisti

Glerskífa

Hringþétti úr pólýtetraflúoretýlen

Enduráfilling

Hengi

Tappi

Ró

Hringlagi þétti

Aftara hólf

Fremra hólf

Skrúfur til festingar

LJÓSDEYFNIMÆLIRINN

2. Ljósdeyfnimælirinn er búnaður sem mælir gegnumferð ljóss. Ljosi frá halógenlampa er beint gegnum samanburðarhólf (tómt hólf án glugga eða vökva) á ljósnema og það borið saman við ljósið sem beint er gegnum tilraunahólf, sem hýsir hólfid með glærinni, og á ljósnema. Tækið mælir muninn á ljósmagninu sem nær til ljósnemanna og sýnir ógagnsæisgildi í tölustöfum á stafrænum skjá. Ógagnsæiseiningar eru ákvarðaðar.
3. Ljósdeyfnimælirinn á að gefa línulega svörun fyrir röð ógagnsæismælinga sem ná yfir þröskuldsgildin sem eru notuð fyrir mismunandi flokkun eins og lýst er í spálíkaninu (þ.e. upp að þröskuldsgildinu sem ákvarðar ætandi/mjög ertandi eiginleika). Nauðsynlegt er að kvarða ljósdeyfnimælinn með því að nota röð af kvörðunarþynnum til að tryggja línulegar og nákvæmar mælingar upp að 75–80 ógagnsæiseiningum. Kvörðunarþynnunum (ógagnsæjum þynnum úr pólýester) er komið fyrir í kvörðunarhólfinu (glæruhólf sem er gert til að halda kvörðunarþynnunum) og lesið af ljósdeyfnimælinum. Kvörðunarhólfid er gert til þess að halda kvörðunarþynnunum í um það bil sömu fjarlægð milli ljóssins og ljósnemans og glærunar væru settar í við ógagnsæimælingarnar. Fyrst er ljósdeyfnimælirinn kvarðaður við 0 ógagnsæiseiningar með því að hafa kvörðunarhólfid án kvörðunarþynnu. Síðan er þremur mismunandi kvörðunarþynnum komið fyrir í kvörðunarhólfinu, einni í einu, og ógagnsæið mælt. Kvörðunarþynnur 1, 2 og 3 eiga að gefa niðurstöður sem eru jafnar gildinu sem stillt er á, 75, 150 og 225 ógagnsæiseiningar í þeirri röð, $\pm 5\%$

B.48. ICE-PRÓFUNARAÐFERÐIN (AÐFERÐ TIL PRÓFUNAR Á EINANGRUÐU AUGA ÚR KJÚKLINGI (E. ISOLATED CHICKEN EYE (ICE) TEST METHOD)) TIL GREININGAR Á EFNUM SEM ERU ÆTANDI OG MJÖG ERTANDI FYRIR AUGU

INNGANGUR

1. ICE-prófunaraðferðin er aðferð til prófunar í glasi sem hægt er að nota, við tilteknar aðstæður og með tilgreindum takmörkunum, til að flokka efni og blöndur sem ætandi og mjög ertandi fyrir augu (1., 2. og 3. heimild). Í þessari prófunaraðferð eru mjög ertandi efni skilgreind sem efni sem kalla fram augnskemmdir sem eru viðvarandi hjá kaninum í a.m.k. 21 dag eftir að efnið er borið á. Þótt ICE-prófunaraðferðin sé ekki talin gild sem heildarvalkostur í stað augnprófunar í lifi á kaninum er hún ráðlögð sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun vegna lögbundinnar flokkunar og merkingar innan tilgreinds notkunarviðs (4. og 5. heimild). Prófunarefni og blöndur (6. heimild), sem eru jákvæð í þessari greiningu, má flokka sem augnættandi eða mjög ertandi án þess að gera frekari prófanir á kaninum. Efni, sem reynist neikvætt í prófun, þarf að prófa á kaninum eftir raðprófunaráætlun eins og tilgreint er í OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir (7. heimild) (kafla B.5 í þessum viðauka).
2. Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðunum sem eru notaðar til að meta mátt prófunarefnisins til ætandi eða mjög ertandi áhrifa á augu með mælingu á getu þess til að kalla fram eiturrhif í auga sem er numið brott úr kjúklingi. Eiturhrið á glæruna eru mæld með i) eigindlegu mati á ógagnsæi, ii) eigindlegu mati á skemmdum á þekju sem er byggt á því að borin er flúrskinslausn á augað (flúrskinsgeymd), iii) meginlegrri mælingu á aukinni þykkt (bólgu) og iv) eigindlegu mati á stórsæjum, formfræðilegum skemmdum á yfirborðinu. Ógagnsæi glæru, bólga og skemmdir eftir váhrif frá prófunarefninu eru metin hvert um sig og síðan í sameiningu til að fá fram flokkun á augnertingu.
3. Augnertandi efni, sem kalla fram vefjaskemmdir sem ganga til baka á innan við 21 degi, og efni, sem eru ekki ertandi, hafa einnig verið prófuð með ICE-prófunaraðferðinni. Nákvæmni og áreiðanleiki ICE-prófunaraðferðarinnar hafa þó ekki verið formlega metin fyrir efni í þessum undirflokkum.
4. Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

ATRIDI, SEM ÞARF AÐ HAFI HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

5. Þessi prófunaraðferð er byggð á aðferðarlýsingu samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða (ICCVAM) fyrir ICE- prófunaraðferð (8. heimild), sem var þróuð í kjölfar alþjóðlegrar fullgildingarrannsóknar (4., 5. og 9. heimild), með tillagi frá Evrópumisstöð um fullgildingu staðgönguáðferða (ECVAM), miðstöð Japans fyrir fullgildingu staðgönguáðferða (JaCVAM) og TNO-rannsóknastofnuninni í Hollandi, deild eiturefnafræði og hagnýtrar lyfjafræði (e. TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Netherlands)). Aðferðarlýsingin er byggð á upplýsingum úr birtum aðferðarlýsingum, sem og þeirri aðferðarlýsingu sem TNO-rannsóknastofnunin notar nú (10.–14. heimild).
6. Tilgreindar takmarkanir fyrir þessa prófunaraðferð byggjast á hlutfalli falsjákvæðra niðurstaðna fyrir alkóhól og hlutfalli falsneikvæðra niðurstaðna fyrir föst efni og yfirborðsvirk efni (sjá 47. mgr.) (4. heimild). Ef efni í þessum efnafræðilegu og eðlisfræðilegu flokkum eru ekki höfð í gagnasafninu bætir það umtalsvert áreiðanleika ICE-prófunarinnar í öllum flokkunarkerfum Evrópusambandsins (ESB), Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna (EPA) og í hnattsamræmda kerfinu (HSK) (4. heimild). Miðað við tilgang þessarar greiningar (þ.e. að greina aðeins efni sem eru augnættandi eða mjög augnertandi) er hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna ekki mikilvægt þar eð slík efni myndu því næst verða prófuð á kaninum eða, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, með öðrum tilhlýðilega fullgiltum prófunum í glasi þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga. Auk þess gerði núverandi gagnabanki ekki kleift að meta suma flokka íðefna eða vöruflokka (t.d. blöndur) á fullnægjandi hátt. Rannsakendur geta þó íhugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir allar gerðir prófunarefna (þ.m.t. blöndur) og samþykkja að jákvæð niðurstaða sé vísbending um ætandi eða mjög ertandi svör. Þó skal túlka jákvæðar niðurstöður, sem eru fengnar með alkóhólum, með varúð vegna hættunnar á oftúlkun.
7. Allar aðferðir, þar sem notuð eru augu úr kjúklingum, skulu fylgja viðeigandi reglum og verklagi prófunarstöðvarinnar fyrir meðhöndlun á efnum sem eru unnin úr mönnum eða dýrum, þ.m.t., en ekki takmarkað við, vefjum og vefjavökvum. Mælst er til að notaðar séu alþjóðlegrar varúðarráðstafanir fyrir rannsóknarstofur (15. heimild).
8. Þær takmarkanir eru á prófunaraðferðinni að hún tekur ekki til tár- eða lituskaða þrátt fyrir að í henni sé tekið tillit til einhverra af áhrifunum á augu, sem eru metin með aðferðinni til prófunar á augnertingu hjá kaninum, og til alvarleika þeirra að einhverju marki. Þótt ekki sé heldur hægt að meta með ICE-prófunaraðferðinni sem slíkri hvort vefjaskemmdir í augum gangi til baka þá hefur verið lagt til, á grundvelli rannsókna á kaninu augum, að nota megi mat á upphafsdypt glæruskaða til að greina á milli áhrifa, sem ganga ekki til baka, og þeirra sem ganga til baka (16. heimild). Að lokum gefur ICE-prófunaraðferðin ekki færi á mati á möguleikanum á altækum eiturrhifum sem tengjast váhrifum á augu.
9. Verið er að reyna að lýsa enn frekar gagnsemi og takmörkunum ICE-prófunaraðferðarinnar að því er varðar sanngreiningu efna, sem eru ekki mjög ertandi, og efna sem eru ekki ertandi (sjá einnig 48. mgr.). Notendur eru einnig hvattir til að láta fullgildingarstofnunum í té sýnishorn og/eða gögn fyrir formlegt mat á hugsanlegum notum ICE-prófunaraðferðarinnar í framtíðinni, þ.m.t. til að sanngreina efni, sem eru ekki mjög augnertandi, og efni sem eru ekki augnertandi.

10. Sérhver rannsóknarstofa, sem gerir þessa greiningu í fyrsta sinn, skal nota hæfnisíðefnin sem kveðið er á um í 2. viðbæti. Rannsóknarstofu er heimilt að nota þessi efni til að sýna fram á tæknilega færni sína við framkvæmd ICE-prófunaraðferðarinnar áður en hún leggur inn gögn, fengin með ICE-prófun, vegna lögbundinnar flokkunar í hættuflokka.

MEGINREGLUR PRÓFUNARINNAR

11. ICE-prófunaraðferðin er líffærislíkan í glasi sem viðheldur í stuttan tíma virkni auga úr kjúklingi. Með þessari prófunaraðferð eru skemmdir af völdum prófunarefnisins metnar með ákvörðun á bólgu í glæru, ógagnsæi og flúrskinsgeymd. Þó að seinni breytur tvær feli í sér eigindlegt mat er greiningin á bólgu í glæru megindeg. Hver mæling er ýmist umreiknuð yfir í megindeg stig, sem eru notuð til að reikna út heildarstuðul fyrir ertingu, eða fær eigindlega undirflokkun sem er notuð til að tilgreina flokkun sem ætandi eða mjög ertandi. Síðan er hægt að nota hvora sem er af þessum niðurstöðum til að spá fyrir um mátt prófunarefnis til augnætingar og mikillar augnæringar í lífi (sjá „Viðmiðanir fyrir ákvarðanir“).

Uppruni og aldur augna úr kjúklingum

12. Venjan er sú að í þessari greiningu séu notuð augu úr kjúklingum sem eru fengnir frá sláturhúsi, þar sem þeim er slátrað til manneldis, og því engin þörf á tilraunadýrum. Eingöngu eru notuð augu úr heilbrigðum dýrum sem eru talin hæf til að fara inn í matvælaferlið.
13. Þó að ekki hafi verið gerð rannsókn með samanburði til að meta kjöraldur kjúklinganna er venjan sú að aldur og þyngd kjúklinga, sem eru notaðir í þessari prófunaraðferð, sé samkvæmt hefðbundinni vinnslu í alifuglasláturhúsi (þ.e. um það bil 7 vikna gamlir, 1,5–2,5 kg.).

Söfnun og flutningur augna til rannsóknarstofunnar

14. Hausarnir skulu fjarlægðir um leið og kjúklingarnir hafa verið róaðir, yfirleitt með rafstuði, og skorið hefur verið í hálsinn til blóðtæmingar. Kjúklinganna skal aflað í nágrenni við rannsóknarstofuna svo að hægt sé að flytja hausana á milli sláturhúss og rannsóknarstofu nægilega fljótt til að skemmdir og/eða bakteríusmit verði í lágmarki. Tímabilið milli töku kjúklingahausanna og notkunar augnanna samkvæmt ICE-prófunaraðferðinni skal vera sem styst (að jafnaði styttra en tvær klukkustundir) og skal sýnt fram á að lengd þess spilli ekki niðurstöðum greiningarinnar. Þær niðurstöður eru byggðar á valviðmiðunum fyrir augun, sem og jákvæðum og neikvæðum svörum úr samanburðarprófunum. Öll augu, sem eru notuð í greiningunni, skulu vera úr sama samsafni augna, teknu á tilgreindum degi.
15. Þar eð augun eru skorin úr á rannsóknarstofunni eru hausarnir fluttir ósnertir frá sláturhúsinu í plastílátum við umhverfishita og haldið rökum með klútum sem eru vættir í jafnþrýstinni saltlausn.

Valviðmiðanir fyrir augu sem eru notuð í ICE-prófuninni

16. Augu með mörg grunnviðmiðunarstig litunar eftir flúrskinslausn (þ.e. > 0,5) eða mörg ógagnsæisstig glæru (þ.e. > 0,5) eftir brottnáam er hafnað.
17. Hver meðferðarhópur og samskeiða, jákvæður samanburður samanstendur af minnst þremur augum. Neikvæði samanburðarhópurinn eða samanburðurinn með leysi (ef notaður er annar leysir en saltlausn) er minnst eitt auga.

VINNUAÐFERÐ

Undirbúningur augnanna

18. Augnlokini eru skorin varlega burt og þess gætt að skemma ekki glæruna. Heilleiki glærunnar er metinn snögg með dropa af 2% (massi/rúmmál) natríumflúrskinslausn sem er höfð á yfirborði glærunnar í nokkrar sekúndur og síðan skoluð af með jafnþrýstinni saltlausn. Síðan eru augun, sem hafa verið meðhöndluð með flúrskinslausn, skoðuð með raufarlampasmásjá til að ganga úr skugga um að glæran sé óskemmd (þ.e. að stig flúrskinsgeymdar og ógagnsæi glæru séu ≤ 0,5).
19. Ef augað er óskemmt er það síðan skorið alveg úr hausakúpinni og þess gætt að skemma ekki glæruna. Augað er togað úr tóttinni með því að taka þétt í blikhimnuna með læknatöng og klippt á augnvöðvana með bognum skærum með ávölum oddi. Það er mikilvægt að skemma ekki glærunar með of miklum þrýstingi (þ.e. valda þrýstingsskemmdum).
20. Skilja skal eftir sýnilegan hluta af sjóntauginni fastrí við augað þegar það er fjarlægt úr tóttinni. Þegar augað hefur verið fjarlægt úr tóttinni er það sett á ídrægt undirlag og blikhimnan og annar bandvefur skorin frá.

21. Brottnumda auganu er komið fyrir í klemmu úr ryðfríu stáli og með glærana lóðrétt. Klemman er síðan flutt í hólf í yfirhellingarbúnaðinum (e. superfusion apparatus) (16. heimild). Koma skal klemmunum þannig fyrir í yfirhellingarbúnaðinum að jafnhrysting saltlausn leki yfir alla glærana. Hólfín í yfirhellingarbúnaðinum skulu stillt á hitastigið $32 \pm 1,5$ °C. Í 3. viðbæti er skýringarmynd af dæmigerðum yfirhellingarbúnaði og augnklemmum sem hægt er að kaupa eða búa til. Hægt er að breyta búnaðinum svo að hann uppfylli þarfir einstakra rannsóknarstofa (t.d. til að hægt sé að koma fyrir mismunandi fjölda augna).
22. Þegar augunum hefur verið komið fyrir í yfirhellingarbúnaðinum eru þau skoðuð aftur með raufarlampasmásjá til að ganga úr skugga um að þau hafi ekki skemmt þegar þau voru skorin úr. Um leið skal mæla þykkt glæranna á topppunkti hennar (e. apex) með þykktarmælningu á raufarlampasmásjóni. Augum með i) flúrskinsgeymdarstig sem eru $> 0,5$, ii) ógagnsæi glæru sem er $> 0,5$ eða iii) einhver viðbótarkerki um skemmdir skal skipt út. Augu, sem er ekki hafnað vegna einhverra þessara viðmiðana en eru með glæruþykkt sem vikur meira en 10% frá meðalgildi allra augna, skal hafnað. Notendur þurfa að hafa í huga að niðurstöður mælinga á þykkt glæru með raufarlampasmásjá geta verið mismunandi eftir mismunandi stillingum á raufarbreiddinni. Raufarbreiddin skal stillt á 0,095 mm.
23. Þegar búið er að skoða og samþykkja öll augun skulu þau látin standa í u.þ.b. 45–60 mínútur til að jafnvægisstillta þau við prófunarkerfið áður en prófunarefnið er borið á. Eftir jafnvægisstillinguna er skráð núlltilvísunarmæling á þykkt og ógagnsæi glæru sem er grunnviðmiðun (þ.e. tími = 0). Flúrlitunarstiginn, sem voru ákvörðuð þegar augun voru skorin úr, eru notuð sem grunnviðmiðunarmæling fyrir þann endapunkt.

Prófunarefnið borið á

24. Strax eftir núllviðmiðunarmælingarnar er augað tekið (í haldara sínum) úr yfirhellingarbúnaðinum, sett í lárétta stöðu og prófunarefnið borið á glærana.
25. Fljótandi prófunarefni eru að jafnaði prófuð óþynnt en það má þynna þau ef það er talið nauðsynlegt (t.d. sem hluti af tilhögun rannsóknarinnar). Mælt er með lífeðlisfræðilegri saltlausn sem leysi fyrir þynnt efni. Þó má einnig nota aðra leysa við stýrð skilyrði en sýna skal fram á heppileika annara leysa en lífeðlisfræðilegrar saltlausnar.
26. Fljótandi prófunarefni eru borin þannig á glærana að prófunarefnið þeki allt yfirborð hennar jafnt (staðalrúmmálið er 0,03 ml).
27. Ef það er gerlegt er skulu föst efni möluð eins fint og unnt er í mortéli með staut eða öðru sambærilegu mólunartæki. Dufnið er borið þannig á glærana að prófunarefnið þeki allt yfirborð hennar jafnt (staðalmagnið er 0,03 g).
28. Prófunarefnið (fljótandi eða fast) er haft á í 10 sekúndur og síðan skolað af auganu með jafnhrystinni saltlausn (um það bil 20 ml) við umhverfishita. Augað (í haldara sínum) er síðan sett aftur í yfirhellingarbúnaðinn í upphaflegu, upprétu stöðunni.

Samanburðarefni

29. Í hverri tilraun skal vera samskeiða, neikvæður samanburður eða samanburður með leysi eða burðarefni, og jákvæður samanburður.
30. Ef prófaðir eru óþynntir vökvar eða föst efni skal nota lífeðlisfræðilega saltlausn sem samskeiða, neikvæðan samanburð í ICE-prófunaraðferðinni til að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að tryggja að greiningarskilyrðin leiði ekki af sér óviðeigandi ertingarsvörun.
31. Ef prófaðir eru þynntir vökvar er samskeiða samanburðarhópur með leysi eða burðarefni hafður með í prófunaraðferðinni til að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að tryggja að greiningarskilyrðin leiði ekki af sér óviðeigandi ertingarsvörun. Eins og fram kemur í 25. lið má aðeins nota leysi eða burðarefni sem sýnt hefur verið fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið.

32. Þekkt, augnertandi efni er haft með í hverri tilraun sem samskeiða, jákvæður samanburður til að sannreyna að fram komi viðeigandi svörum. Þar eð ICE-greiningin er notuð í þessari prófunaraðferð til að greina ætandi eða mjög ertandi efni skal jákvæði samanburðurinn vera viðmiðunarefni sem framkallar mikla svörum með þessari prófunaraðferð. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörum jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi mikla svörum þó ekki vera of kröftug. Fá skal fram nóg af gögnum um jákvæða samanburðinn úr prófunum í glasi til að unnt sé að reikna út tölfræðilega skilgreint, viðunandi svið fyrir hann. Ef ekki eru tiltæk fullnægjandi rannsóknarsöguleg gögn úr ICE-prófunaraðferð fyrir tiltekinn, jákvæðan samanburð getur þurft að gera rannsóknir til að fá þær upplýsingar.
33. Dæmi um jákvæðan samanburð fyrir fljótandi prófunarefni eru 10% ediksýra eða 5% bensalkóníumklór en dæmi um jákvæðan samanburð fyrir föst prófunarefni eru natriumhýdroxíð eða imidasól.
34. Viðmiðunarefni (e. benchmark substance) eru gagnleg til að meta augnertingarmátt óþekktra iðefna í tilgreindum iðefna- eða vöruflokki eða til að meta hlutfallslegan ertingarmátt augnertandi efnis á tilteknu ertingarsvörundarsviði.

Endapunktur mældir

35. Meðhöndlaðar glæru eru metnar fyrir meðhöndlunina og frá og með 30, 75, 120, 180 og 240 mínútum (± 5 mínútur) eftir skolun að lokinni meðhöndluninni. Með þessum tímamörkum fæst fullnægjandi fjöldi mælinga á fjögurra klukkustunda meðhöndlunartímabilinu og nægur tími milli mælinga til að gera tilskildar athuganir á öllum augum.
36. Endapunkturarnir, sem eru metnir, eru ógagnsæi glæru, bólga, flúrskinsgeymd og formfræðileg áhrif (t.d. holun þekju (e. pitting) eða los á henni (e. loosening)). Allir endapunkturarnir, að flúrskinsgeymd undantekinni (sem er aðeins ákvörðuð í formeðhöndluninni og 30 mínútum eftir váhrif frá prófunarefninu), eru ákvarðaðir á hverjum af framangreindum tímamörkum.
37. Ráðlagt er að nota ljósmyndir til að skrá ógagnsæi glæru, flúrskinsgeymd, formfræðileg áhrif og, ef hún er athuguð, vefjameinafræði.
38. Eftir lokarannsóknina í lok fjögurra klukkustunda tímabilsins er ráðlagt að varðveita augun í viðeigandi festiefni (t.d. formalíni með hlutlausum jafna) vegna hugsanlegrar, vefjameinafræðilegrar rannsóknar.
39. Bólga í glæru er ákvörðuð út frá mælingum á glæruþykkt sem eru gerðar með glæruþykktarmæli á raufarlampasmásjá. Hún er gefin upp í hundradshlutum og er reiknuð út frá mælingum á glæruþykkt samkvæmt eftirfarandi formúlu:

$$\left(\frac{\text{glæruþykkt á tímamarki } t - \text{glæruþykkt á tímamarki } = 0}{\text{glæruþykkt á tímamarki } = 0} \right) \times 100$$

40. Meðalhundraðshluti bólgu í glæru fyrir öll prófunaraugun er reiknaður fyrir alla athugunartímamörk. Síðan er hverju prófunarefni gefin heildarstig til undirflokunar (e. overall category score) sem byggjast á hæsta meðalgildi fyrir bólgu í glæru, eins og það mælist á hvaða tímamarki sem er.
41. Ógagnsæisstig glæru reiknast út frá því svæði á glærinni sem er ógagnsæjast. Meðalgildi ógagnsæis glæru fyrir öll prófunaraugun er reiknað fyrir alla athugunartímamörk. Síðan er hverju prófunarefni gefin heildarstig til undirflokunar sem byggjast á hæsta meðalgildi fyrir ógagnsæi glæru, eins og það mælist á hvaða tímamarki sem er (tafla 1).

Tafla 1

Ógagnsæisstig glæru

Stig	Athugun
0	Ekkert ógagnsæi
0,5	Mjög lítið ógagnsæi

Stig	Athugun
1	Dreifð eða óljós svæði, smáatriði í lithimnu mjög greinileg
2	Auðgreinanleg, hálf gagnsæ svæði, smáatriði í lithimnu örllítið óskýr
3	Mjög mikið ógagnsæi glæru, engin smáatriði lithimnu sjáanleg, stærð sjáaldurs varla greinanleg
4	Ógagnsæi glæru algert, lithimna sést ekki

42. Meðalgildi flúrskingsgeymdar fyrir öll prófunaraugu er aðeins reiknað fyrir 30 mínútna athugunartímupunktinn og er notað til að gefa heildarstig til undirflokunar fyrir hvert prófunarefni (tafla 2).

Tafla 2

Flúrskingsgeymdarstig

Stig	Athugun
0	Engin flúrskingsgeymd
0,5	Mjög óveruleg litun stakra frumna
1	Litun stakra frumna, dreifðra um allt meðhöndlaða svæðið á glærunni
2	Þétt litun stakra, staðbundinna frumna eða samliggjandi frumna
3	Flúrskingsgeymd stórra, samliggjandi svæða á glærunni

43. Meðal formfræðilegra áhrifa er „holun“ í frumum glæruþekju, „los“ á þekju, „hrjúfara“ glæruyfirborð (e. roughening) og „viðloðun“ prófunarefnisins við glæruna (e. sticking). Munur getur verið á alvarleika þessara áhrifa og þau geta komið fram samtímis. Flokkun þeirra er huglæg og háð túlkun rannsakandans.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**Mat á gögnum**

44. Meta skal niðurstöður vegna ógagnsæis glæru, bólgu og flúrskingsgeymdar hverja fyrir sig til að fá fram ICE-flokk fyrir hvern endapunkt. Síðan eru ICE-flokkarnir fyrir hvern endapunkt sameinaðir til að fá fram ertingarflokkun fyrir hvert prófunarefni.

Viðmiðanir fyrir ákvarðanir

45. Þegar búið er að meta hvern endapunkt er hægt að ákvarða ICE-flokka í samræmi við fyrirframákveðið svið. Glæruþykkt (3. tafla), ógagnsæi glæru (4. tafla) og flúrskingsgeymd glæru (5. tafla) eru túlkuð með því að nota fjóra ICE-flokka samkvæmt eftirfarandi kvörðum:

Tafla 3

Viðmiðanir fyrir ICE-flokkun á glæruþykkt

Meðalgildi bólgu í glæru (%) (*)	ICE-flokkur
0–5	I
> 5–12	II
> 12–18 (> 75 mín. eftir meðhöndlun)	II
> 12–18 (≤ 75 mín. eftir meðhöndlun)	III
> 18–26	III

Meðalgildi bólgu í glæru (%) (*)	ICE-flokkur
> 26–32 (> 75 mín. eftir meðhöndlun)	III
> 26–32 (≤ 75 mín. eftir meðhöndlun)	IV
> 32	IV

(*) Glærubólguástigin eiga aðeins við ef þykktin er mæld með Haag-Streit BP900 raufarlampasmásjá með dýptarmælitæki nr. I og raufarbreidd stilltri á 9½, sem jafngildir 0,095 mm. Notendur þurfa að hafa í huga að niðurstöður mælinga á þykkt glæru með raufarlampasmásjá geta verið mismunandi eftir mismunandi stillingum á raufarbreiddinni.

Tafla 4

Viðmiðanir fyrir ICE-flokkun á ógagnsæi

Meðalgildi hámarkstiga ógagnsæi (*)	ICE-flokkur
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II.
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Sjá töflu 1.

Tafla 5

Viðmiðanir fyrir ICE-flokkun á meðalgeymd flúrskinslausnar

Meðalstig flúrskinsgeymdar 30 mínútum eftir meðhöndlun (*)	ICE-flokkur
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II.
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Sjá töflu 2.

46. Heildarflokkun á ertingu í glasi fyrir prófefni er metin með því að lesa ertingarflokkunina, sem samsvarar samsettu undirflokkunum sem fram komu fyrir bólgu í glæru, ógagnsæi glæru og flúrskinsgeymd, og beita kerfinu sem er sett fram í töflu 6.

Tafla 6

Heildarflokkun á ertingu í glasi

Flokkun	Samsetning endapunktanna þriggja
Ætandi eða mjög ertandi efni	<p>3 × IV</p> <p>2 × IV, 1 × III</p> <p>2 × IV, 1 × II (*)</p> <p>2 × IV, 1 × I (*)</p> <p>Ógagnsæi glæru er ≥ 3 eftir 30 mín. (í a.m.k. tveimur augum)</p> <p>Ógagnsæi glæru = 4 á hvaða tímamarki sem er (í a.m.k. tveimur augum)</p> <p>Mikið los á þekjunni (í a.m.k. einu auga)</p>

(*) Samsetningar sem ólíklegra er að komi fram

47. Ef prófunarefnið er ekki greint sem augnætandi eða mjög ertandi skal gera frekari prófanir til flokkunar og merkingar þess eins og fram kemur í 1. lið. Heildarnákvæmni ICE-prófunaraðferðarinnar er 83% (120/144) til 87% (134/154), hlutfall falsjávæðra niðurstaðna er 6% (7/122) til 8% (9/116) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna er 41% (13/32) til 50% (15/30), fyrir greiningu augnætandi efna og mjög ertandi efna, þegar aðferðin er borin saman við gögn úr augnprófun á kaninum með aðferð í lífi sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfum EPA (1. heimild), ESB (2. heimild) eða HSK (3. heimild). Þegar efni innan tiltekinnar efnaflokkar (þ.e. alkóhól og yfirborðsvirk efni) eða eðlisfræðilegra flokka (þ.e. fóst efni) eru ekki höfð í gagnasafninu er nákvæmni ICE-prófunar innan ESB-, EPA- og HSK-flokkunarkerfanna á bilinu 91% (75/82) til 92% (69/75), hlutfall falsjávæðra niðurstaðna á bilinu 5% (4/73) til 6% (4/70) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna á bilinu 29% (2/7) til 33% (3/4) (4. heimild).
48. Jafnvel þótt prófunarefni flokkist ekki sem augnætandi eða mjög ertandi geta gögn úr ICE-prófun, í tengslum við prófunargögn úr augnprófun í lífi á kaninum eða úr tilhlýðilega fullgilti prófun í glasi, verið gagnleg til frekara mats á gagnsemi og takmörkunum ICE-prófunaraðferðarinnar til greiningar á efnum sem eru ekki mjög ertandi og efnum sem eru ekki ertandi (verið er að þróa leiðbeiningarskjal um notkun aðferða til prófunar í glasi á augneiturhrifum).

Viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar

49. Prófun telst samþykktarhæf ef samskeiða, neikvæður samanburður eða samanburður með burðarefni eða leysi og samskeiða, jákvæður samanburður leiða til ertingarflokkunar sem fellur í flokka efna sem eru ekki ertandi, annars vegar, og efna sem eru mjög ertandi eða ætandi hinsvegar.

Prófunarskýrsla

50. Í prófunarskýrslunni skulu vera eftirfarandi upplýsingar ef þær skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar:

Prófunar- og samanburðarefni:

Efnaheiti, s.s. byggingarheiti sem Upplýsingaþjónustan um íðefni (CAS) notar, og þar á eftir önnur þekkt heiti,

CAS-skráningarnúmer (CAS-nr.) ef það er þekkt.

hreinleiki og samsetning efnisins eða blöndunnar (í hundraðshlutum miðað við þyngd) að því marki sem þær upplýsingar eru tiltækar,

eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, s.s. eðlisástand, rokgirni, sýrustig, stöðugleiki, efnaflokkur og vatnsleysni,

meðhöndlun prófunarefnanna eða samanburðarefnanna fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun og mölun),

stöðugleiki, ef hann er þekktur.

Upplýsingar um bakhjarl og prófunarstöð

Heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra,

tilgreining á uppruna augnanna (þ.e. fyrirtækið þar sem þau voru tekin),

skilyrði við geymslu og flutning augnanna (t.d. dagur og stund þegar þau voru tekin, tíminn sem leið fram að því að prófun hófst),

tilteknir eiginleikar dýranna sem augun voru tekin úr (t.d. aldur, kyn, þyngd gjafadýrsins) ef þær upplýsingar eru tiltækar.

Rökstuðningur fyrir vali á prófunaraðferðinni og aðferðarlýsingunni sem eru notuð

Heilleiki prófunaraðferðarinnar

Verklagið sem er notað til að tryggja heilleika (þ.e. nákvæmni og áreiðanleika) prófunaraðferðarinnar yfir tíma (t.d. reglubundin prófun á hæfnisefnum (e. proficiency substance), notkun rannsóknarsögulegra gagna um neikvæðan og jákvæðan samanburð).

Viðmiðanir fyrir samþykktarhæfa prófun

Viðunandi svið samskeiða viðmiðunarsamanburðar, byggð á rannsóknarsögulegum gögnum, ef við á.

Prófunarskilyrði

Lýsing á prófunarkerfinu sem er notað,

raufarlampasmásjái sem er notuð (t.d. tegund),

tækjastillingar fyrir raufarlampasmásjána sem er notuð,

upplýsingar um kjúklungaugun sem eru notuð, þ.m.t. yfirlýsingar um gæði þeirra,

upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð,

styrkur prófunarefnisins eða prófunarefnanna sem eru notuð,

lýsingar á öllum breytingum á prófunarferlinu,

tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn líkansins (t.d. neikvæðan og jákvæðan samanburð, hæfnisefni og viðmiðunarefni),

lýsing á þeim matsviðmiðunum sem eru notaðar.

Niðurstöður

Lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu,

ljósmyndir af auganu, ef við á.

*Umfjöllun um niðurstöðurnar.**Niðurstaða*

HEIMILDIR

- 1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- 2) Reglugerð (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006. Stjttíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 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. Aðgengilegt á:
[\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html\]](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. Aðgengilegt á:
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm\]](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. Aðgengilegt á:
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](http://ecvam.jrc.it/index.htm).

- 6) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB. Stjtið. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.
- 7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Aðgengilegt á:
[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. Í: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Aðgengilegt á:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- 9) ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Aðgengilegt á:
[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). Aðgengilegt á:
[<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. Aðgengilegt á:
[<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. Aðgengilegt á:
[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. Aðgengilegt á:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

1. viðbætur

SKILGREININGAR

Nákvæmni: mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð.

Viðmiðunarefni: Efni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunarefni. Viðmiðunarefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) samræmdan og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við efnaflokkinn sem er verið að prófa, iii) þekkt eðlisfræðilega/efnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Glæra: Gagnsær, fremsti hluti augans sem þekur lithimnuna og augasteininn og hleypir ljósi inn í augað.

Ógagnsæi glæru: Mæling á því að hvaða marki glæran verður ógagnsæ eftir váhrif frá prófunarefni. Aukið ógagnsæi glæru bendir til skemmda á henni.

Glærubólga: Hlutlæg mæling í ICE-prófuninni á því að hvaða marki glæran þenst út eftir váhrif frá prófunarefni. Hún er gefin upp sem hundraðshluti og er reiknuð út frá grunnviðmiðunarmælingum (áður en prófunarefni er borið á) á glæruþykkt og þykktinni sem er skráð með reglulegu millibili eftir váhrif frá prófunarefninu í ICE-prófuninni. Umfang bólgu í glæru er til marks um skemmdir á henni.

1. undirflokkur EPA: Ætandi áhrif (eyðing augnvefja sem gengur ekki til baka) eða áhrif á glæru eða viðvarandi erting í meira en 21 dag (1. heimild).

ESB-undirflokkur H41: Vefjaskemmdir í auga eða alvarlega sjónskerðing, eftir að prófunarefni hefur verið borið framan á augað (2. heimild), sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá áburði.

Hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna: Hlutfall allra jákvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna: Hlutfall allra neikvæðra efna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Flúrskinsgeymd: Huglæg mæling í ICE-prófuninni á geymd natríumflúrskinslausnar í þekjufrumum glærunnar eftir váhrif frá prófunarefni. Umfang flúrskinsgeymdar er til marks um skemmdir á glæruþekjunni.

HSK (hnattsamræmda kerfið til flokkunar og merkingar á íðefnum) (e. GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. hættumerkja, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða, til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif íðefnanna í því skyni að vernda fólk (þ.m.t. vinnuveitendur, launafólk, flytjendur, neytendur og bráðaliða) og umhverfið (3. heimild).

1. undirflokkur HSK: Vefjaskemmdir í auga eða alvarlega sjónskerðing, eftir að prófunarefni hefur verið borið framan á augað (3. heimild), sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá áburði.

Hætta: Sá eðlislegi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur verður fyrir váhrifum frá því efni.

Neikvæður samanburður: Ómeðhöndlað, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunarefni og öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn víxlverkar við prófunarkerfið.

Efni sem eru ekki ertandi: Efni sem flokkast ekki sem augnertandi í I., II. eða III. undirflokk EPA, ESB-undirflokk H41 eða H36 eða HSK-undirflokk 1, 2A eða 3B (1., 2. og 3. heimild).

Augnertandi efni: a) Efni sem veldur vefjaskemmdum í auga sem ganga ekki til baka, b) efni sem flokkast sem augnertandi í 1. undirflokk HSK, I. undirflokk EPA eða ESB-undirflokk H41 (1., 2. og 3. heimild).

Augnertandi efni: a) Efni sem framkallar breytingu, eftir að það er borið framan á augað, sem gengur til baka, b) efni sem flokkast sem augnertandi efni í II. eða III. undirflokk EPA, ESB-undirflokk H36 eða HSK-undirflokk 2A eða 2B (1., 2. og 3. heimild).

Mjög augnertandi efni: a) Efni sem veldur vefjaskemmdum í auganu, eftir að það er borið framan á augað, sem ganga ekki til baka innan 21 dags frá áburði, eða sem veldur alvarlegri sjónskerðingu, b) Efni sem flokkast sem augnertandi í 1. undirflokk HSK, I. undirflokk EPA eða ESB-undirflokk H41 (1., 2. og 3. heimild).

Jákvæður samanburður: Samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi mikla svörun þó ekki vera of kröftug.

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmi hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum yfir tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einsetursamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni.

Raufarlampasmásjá: Tæki sem er notað til að rannsaka augað beint með stækkun í tvísvæissmásmá sem skapar þrívíða, upprétta mynd. Í ICE-prófuninni er þetta tæki notað til að skoða fremri hluta kjúklingaauga sem og til þess að mæla þykkt glærunnar hlutlægt með aukabúnaði sem mælir dýpt.

Samanburður með leysi eða burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og er unnið með sýnum, sem eru meðhöndluð með prófunarefninu, og með öðrum samanburðarsýnum til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunarefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða, neikvæðu samanburðarsýni sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Stígskipt prófun: Þrepskipt prófunaráætlun þar sem allar upplýsingar um prófunarefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunarefnis á grundvelli fyrirbyggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunarefnis á grundvelli fyrirbyggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

Fullgilt prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem sætt hefur fullgildingarrannsókn til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika fyrir tiltekinn tilgang. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nákvæm og áreiðanleg til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang.

Vægi rökstuddra vísbendinga: Ferli sem felst í því að vega og meta styrkleika og veikleika ýmissa upplýsinga til að komast að niðurstöðu um hugsanlega hættu af tilteknu efni og styðja þá niðurstöðu rökum.

2. viðbætur

HÆFNISEFNI FYRIR ICE-PRÓFUNARAÐFERÐINA

Áður en prófunaraðferð, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar kunna rannsóknarstofur að vilja sýna fram á tæknilega hæfni með því að greina rétt augnertingarflokkun efnanna tíu sem eru ráðlögð í töflu 1. Þau efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið staðbundinnar ertingar eða ætingar á augum samkvæmt niðurstöðum úr augnprófun í lífi á kaninum (viðmiðunarregla 405 um prófanir) (þ.e. flokkum 1, 2A, 2B og óflokkað og merkt samkvæmt hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (3. og 7. heimild). Með hliðsjón af fullgilttri gagnsemi þessara greininga (þ.e. að greina aðeins efni sem eru augnætandi eða mjög augnertandi) eru það þó aðeins tvær prófunarniðurstöður sem miðast við flokkun (ætandi eða mjög ertandi efni eða ekki ætandi eða ekki mjög ertandi efni) sem gera kleift að sýna fram á hæfni viðkomandi rannsóknarstofu. Aðrar valviðmiðanir voru að efni fengjust á almennum markaði, að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og að tiltæk væru hágæða gögn, fengin með aðferðunum tveimur í glasi sem verið er að þróa viðmiðunarreglur um prófanir fyrir. Af þessum sökum voru valin ertandi efni af skrá samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða yfir 122 viðmiðunarefni sem eru ráðlögð til fullgildingar á aðferðum til prófunar í glasi á augneiturhrifum (sjá viðbæti H, Ráðlögð viðmiðunarefni samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða (e. ICCVAM Recommended Reference Substances) (4. heimild). Tilvísunargögn er að finna í bakgrunnsskjölum vegna endurskoðunar samræmingarnefndar stofnana um fullgildingu staðgönguáðferða á ICE-prófunaraðferðinni og prófunaraðferðinni með einangruðu auga úr kjúklingi (ICE) (17. og 18. heimild).

Tafla 1

Efni sem eru ráðlögð til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir ICE-prófunaraðferðina.

Efni	CAS-númer	Efnaflokkur (1)	Eðlisástand	Flokkun í lífi (2)	Í glasi-flokkun (3)
Bensalkóníum-klóríð (5%)	8001-54-5	Óniumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Klórhexidín	55-56-1	Amin, amidín	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Díbensóyl-L-vínsýra	2743-38-6	Karboxýlsýra, estri	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Imidasól	288-32-4	Heturhringur	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Þríklóredíksýra (30%)	76-03-9	Karboxýlsýra	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
2,6-díklór-bensóylklóríð	4659-45-4	Asýlhalið	Vökvi	Undirflokkur 2A	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Etýl-2-metýla-setóasetat	609-14-3	Ketón, estri	Vökvi	Undirflokkur 2B	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Ammóníum nítrat	6484-52-2	Ólífrænt salt	Fast efni	Undirflokkur 2A	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Glýseról	56-81-5	Alkóhól	Vökvi	Ekki merkt	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
n-hexan	110-54-3	Vetniskolefni (keðjulaga)	Vökvi	Ekki merkt	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni

Skammstafanir CAS-númer= Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um iðefni

(1) Hverju prófunarefni var skipað í efnaflokk með því að nota staðlað flokkunarkerfi, byggt á flokkunarkerfi National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(2) Byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi á kanínuaugum (OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir) og með notkun hnattsamræms kerfis Sameinuðu þjóðanna (3. og 7. heimild).

(3) Byggt á niðurstöðum úr BCOP- og ICE-prófunum.

3. viðbætur

Skýringarmyndir af yfirhellingarbúnaði og augnklemmum fyrir ice-prófun

(Sjá Burton et al. (17. heimild) fyrir ítarlegri, almennar lýsingar á yfirhellingarbúnaði og augnklemmu)

