

B.68 IN-VITRO-PRÜFMETHODE MIT KURZZEITEXPOSITION ZUR ERMITTLUNG VON i) CHEMIKALIEN, DIE SCHWERE AUGENSCHÄDEN VERURSACHEN, UND ii) CHEMIKALIEN, DIE KEINE EINSTUFUNG ALS AUGENREIZEND ODER SCHWER AUGENSCHÄDIGEND ERFORDERN [23](#)

Die vollständige Beschreibung dieser Prüfmethode wurde gestrichen.

Die gleichwertige internationale Prüfmethode ist in Teil 0 [Tabelle 2](#) aufgeführt.

Auszug aus: Verordnung (EU) 2019/1390 der Kommission vom 31. Juli 2019 zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 491 (2017). Die Prüfmethode zur Untersuchung unter Kurzzeitexposition ist eine *In-Vitro*-Methode, die unter bestimmten Umständen und mit bestimmten Einschränkungen zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) verwendet werden kann, die schwere Augenschädigungen bzw. Augenreizungen im Sinne des GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (UN) (1) und der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP-Verordnung) (1) induzieren.
2. Über viele Jahre wurde das augengefährdende Potenzial von Chemikalien in erster Linie mit einem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (PM B.5 (8), entsprechend OECD TG 405) geprüft. Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass der *In-vivo*-Kaninchenaugentest in absehbarer Zukunft nicht in vollem Umfang durch eine einzelne alternative *In-vitro*-Prüfung ersetzt werden kann, die geeignet wäre, das gesamte Spektrum augenreizender bzw. schwer augenschädigender Reaktionen auf unterschiedliche Chemikalienklassen vorherzusagen. Unter Umständen könnte der Kaninchenaugentest jedoch durch strategische Kombinationen mehrerer alternativer Prüfmethoden im Rahmen einer (gestuften) Prüfstrategie vollständig ersetzt werden (2). Der Top-down-Ansatz ist zur Prüfung von Chemikalien ausgelegt, bei denen nach verfügbaren Informationen davon ausgegangen werden kann, dass sie stark reizend wirken oder schwere Augenschäden hervorrufen können. Mit dem Bottom-up-Ansatz werden Chemikalien geprüft, bei denen ausgehend von verfügbaren Informationen angenommen werden kann, dass sie keine Augenreizungen in einem Umfang induzieren, der eine Einstufung erfordern würde. Die Kurzzeit-Prüfmethode wird nicht als geeignet betrachtet, den *In-vivo*-Kaninchenaugentest vollständig zu ersetzen. Sie kann jedoch im Rahmen einer gestuften Prüfstrategie zu gesetzgeberischen Einstufungs- und Kennzeichnungszwecken verwendet werden (beispielsweise mit dem Top-down-/Bottom-up-Ansatz), um (i) Chemikalien, die schwere Augenschädigungen (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) induzieren, und (ii) Chemikalien (außer stark flüchtigen Stoffen und allen festen Chemikalien mit Ausnahme von Tensiden), die keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) erfordern, ohne weitere Prüfungen zu erkennen (1) (2). Bei Chemikalien, für die aufgrund der Kurzzeit-Prüfmethode weder eine schwer augenschädigende Wirkung (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) vorhergesagt noch erwartet wird, dass sie Augenreizungen oder schwere Augenschädigungen induzieren (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), müssen weitere Prüfungen durchgeführt werden, um eine endgültige Einstufung vornehmen zu können. Außerdem sollten die zuständigen Regulierungsbehörden konsultiert werden, bevor die Kurzzeitprüfung mit einem Bottom-Up-Ansatz unter Berücksichtigung einer anderen Klassifizierungsregelung als der des UN GHS bzw. der CLP-Verordnung durchgeführt wird. Die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode und die Anwendung dieser Prüfmethode sollten unter Berücksichtigung des OECD-Leitliniendokuments über integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA = Integrated Approaches to Testing and Assessment) zur Untersuchung von schweren Augenschädigungen und von Augenreizungen (14) erfolgen.
3. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte zur Beurteilung des augengefährdenden Potenzials einer Prüfchemikalie anhand ihrer Fähigkeit, in der Kurzzeitprüfung eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen. Die zytotoxische Wirkung von Chemikalien auf Hornhaut-Epithelzellen ist eine erhebliche Wirkungsweise, die zu Schädigungen des Hornhautepithels und zu Augenreizungen führt. Die Zellviabilität wird bei der Kurzzeit-Prüfmethode durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, auch als Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid bezeichnet) zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (3). Die ermittelte Zellviabilität wird mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen (relative Viabilität) und zur Abschätzung der potenziellen Augengefährdung durch die Prüfchemikalie verwendet. Prüfchemikalien sind dann als UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 einzustufen, wenn sowohl die 5- als auch die 0,05 %ige Konzentration zu einer Zellviabilität von kleiner oder gleich (\leq) 70 % führt. Die UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung ist für Prüfchemikalien anzunehmen, bei denen sowohl die 5- als auch die 0,05 %ige Konzentration eine Zellviabilität von mehr als ($>$) 70 % ergibt.
4. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was untersucht wird, und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Kurzzeit-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen. Es gelten die Begriffsbestimmungen der Anlage.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

5. Diese Prüfmethode beruht auf einem von der Kao Corporation entwickelten Protokoll (4), das zwei getrennten Validierungsstudien unterzogen wurde: einer durch den Validierungsausschuss der Japanischen Gesellschaft für Alternativen zu Tierversuchen (JSAE = Japanese Society for Alternative to Animal Experiments) (5) und einer durch

(1) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

das Japanische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (JaCVAM = Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) (6). Das NICEATM und der ICCVAM haben ausgehend von den Berichten über die Validierungsstudien und von Background Review Documents zur Prüfmethode einen Peer-Review durchgeführt (7).

6. Bei der Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), die schwere Augenschädigungen hervorrufen (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) (1), ergaben sich für die mit der Kurzzeit-Prüfmethode an 125 Chemikalien (sowohl Stoffe als auch Gemische) ermittelten Daten eine Gesamtgenauigkeit von 83 % (104/125), eine Falsch-positiv-Rate von 1 % (1/86) und eine Falsch-negativ-Rate von 51 % (20/39) im Vergleich zum *In-vivo*-Kaninchenaugentest (7). Die ermittelte Falsch-negativ-Rate ist in diesem Zusammenhang nicht maßgeblich, da alle Prüfchemikalien, bei denen eine Zellviabilität von ≤ 70 % bei einer Konzentration von 5 % und von > 70 % bei einer Konzentration von 0,05 % gemessen wird, anschließend je nach rechtlichen Anforderungen und gemäß der sequenziellen Prüfstrategie und den gegenwärtig empfohlenen evidenzbasierten Bewertungsansätzen (weight-of-evidence approach) ohnehin mit anderen angemessen validierten *In-vitro*-Prüfmethoden bzw. – als letzte Möglichkeit – mit dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest geprüft werden (1) (8). Hauptsächlich wurden einkomponentige Stoffe geprüft; begrenzte Daten liegen jedoch auch über die Prüfung von Gemischen vor. Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode jedoch für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regelungszweck verwendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefert, und wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs gesetzlich vorgeschrieben ist. Im Hinblick auf die Eignung der Kurzzeit-Prüfmethode zur Entscheidung über die Einstufung von Prüfchemikalien in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 wurden keine sonstigen spezifischen Defizite festgestellt. Prüfer können diese Prüfmethode für Prüfchemikalien einsetzen, und eine Zellviabilität von ≤ 70 % bei Konzentrationen von 5 % und von 0,05 % sollte als Indikator für eine schwer augenschädigende Wirkung betrachtet werden, nach der ohne weitere Prüfungen eine Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 vorzunehmen ist.
7. Bei der Ermittlung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen), bei denen eine Einstufung aufgrund von Augenreizungen und schweren Augenschädigungen nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), ergaben sich für die mit der Kurzzeit-Prüfmethode an 130 Chemikalien (sowohl Stoffe als auch Gemische) ermittelten Daten eine Gesamtgenauigkeit von 85 % (110/130), eine Falsch-negativ-Rate von 12 % (9/73) und eine Falsch-positiv-Rate von 19 % (11/57) im Vergleich zum *In-vivo*-Kaninchenaugentest (7). Wenn stark flüchtige Stoffe und feste Stoffe (außer Tensiden) aus dem Datensatz ausgeschlossen werden, erhöht sich die Gesamtgenauigkeit auf 90 % (92/102), die Falsch-negativ-Rate sinkt auf 2 % (1/54), und die Falsch-positiv-Rate bleibt bei 19 % (9/48) (7). Insofern bestehen die potenziellen Defizite der Kurzzeit-Prüfmethode bei der Ermittlung von Prüfchemikalien, bei denen im Hinblick auf die Augenreizungen und schwere Augenschädigungen keine Einstufung vorzunehmen ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung) in einer hohen Falsch-negativ-Rate bei i) stark flüchtigen Stoffen mit Dampfdrücken über 6 kPa und ii) festen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) mit Ausnahme von Tensiden und Gemischen, die ausschließlich Tenside beinhalten. Bei diesen Chemikalien ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht anzuwenden (7).
8. Zusätzlich zu den in den Nummern 6 und 7 genannten Chemikalien enthält der mit der Kurzzeit-Prüfmethode generierte Datensatz auch interne Daten zu 40 Gemischen, mit denen sich im Vergleich zum *In-vivo*-Draize-Augentest eine Genauigkeit von 88 % (35/40), eine Falsch-positiv-Rate von 50 % (5/10) und eine Falsch-negativ-Rate von 0 % (0/30) bei den Vorhersagen für Gemische ergaben und bei denen eine Einstufung nach dem UN GHS bzw. der CLP-Verordnung nicht erforderlich ist (9). Daher kann die Kurzzeit-Prüfmethode nicht nur bei festen Stoffen, sondern auch bei Gemischen (außer bei festen Gemischen mit Ausnahme von Gemischen, die ausschließlich Tenside enthalten) verwendet werden, um zu ermitteln, ob eine Einstufung nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung). Auch Gemische mit Stoffen mit Dampfdrücken von über 6 kPa sollten mit besonderer Sorgfalt untersucht werden, damit Gefahren nicht unterschätzt werden. Ob die Verwendung der Kurzzeit-Prüfmethode in Betracht kommt, sollte daher auf Einzelfallbasis entschieden werden.
9. Da die Wirkung einer erheblichen Anzahl von in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 einzustufenden Chemikalien unterschätzt wurde und die Chemikalien fälschlich in die Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft wurden bzw. da die Wirkung einer erheblichen Anzahl von Chemikalien, für die eine Einstufung nicht erforderlich ist (UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung), überschätzt wurde und die Chemikalien fälschlich in die Kategorien 2, 2A oder 2B eingestuft wurden, ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht zur Ermittlung von Prüfchemikalien geeignet, die in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 2 oder in die UN-GHS-Kategorien 2A (augenreizend) oder 2B (leicht augenreizend) einzustufen sind (7). Bei diesen Chemikalien können weitere Prüfungen mit einer anderen geeigneten Methode erforderlich sein.

10. Die Kurzzeit-Prüfmethode ist für Prüfchemikalien geeignet, die gelöst oder mindestens 5 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung, in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kochsalz oder in Mineralöl gleichmäßig suspendiert wurden. Für nicht lösliche Prüfchemikalien und für Prüfchemikalien, die nicht mindestens 5 Minuten gleichmäßig in physiologischer Kochsalzlösung, 5 % DMSO in Kochsalz oder in Mineralöl suspendiert werden können, ist die Kurzzeit-Prüfmethode nicht geeignet. In Anbetracht der kurzzeitigen Exposition kann bei der Kurzzeit-Prüfung Mineralöl verwendet werden. Daher ist die Kurzzeit-Prüfmethode für die Vorhersage des augengefährdenden Potenzials wasserunlöslicher Prüfchemikalien (z. B. langkettiger Fettalkohole oder Ketone) geeignet, sofern die Chemikalien in mindestens einem der drei oben genannten Lösungsmittel gemischt werden können (4).
11. Der Begriff „Prüfchemikalie“ bezeichnet bei dieser Prüfmethode das, was untersucht wird, ⁽¹⁾ und bezieht sich nicht auf die Anwendbarkeit der Kurzzeit-Prüfmethode zur Prüfung von Stoffen und/oder Gemischen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Die Kurzzeit-Prüfmethode ist ein zytotoxizitätsbasierter *In-vitro*-Assay, der an einem konfluenten Monolayer von SIRC-Zellen (Kaninchen-Corneazellen des Statens Serum Institut) durchgeführt wird, die auf einer Polycarbonat-Mikrotiterplatte mit 96 Wells kultiviert wurden (4). Nach einer fünfminütigen Exposition gegenüber einer Prüfchemikalie wird die relative Viabilität von SIRC-Zellen mit der MTT-Prüfung gemessen (4). Eine reduzierte Zellviabilität ist ein Indikator für potenzielle schädliche Wirkungen, die zu Augenschäden führen können.
13. Es wurde berichtet, dass 80 % einer auf ein Kaninchenauge applizierten Lösung innerhalb von drei bis vier Minuten bzw. beim Menschen sogar mehr als 80 % innerhalb von einer bis zwei Minuten über den Bindehautsack ausgeschieden werden (10). Bei der Kurzzeit-Prüfmethode wird versucht, diese Expositionszeiten in etwa einzuhalten; dabei wird die Zytotoxizität als Endpunkt für die Beurteilung der Schädigung der SIRC-Zellen nach einer fünfminütigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie angenommen.

NACHWEIS DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

14. Vor der routinemäßigen Anwendung der Kurzzeitprüfung nach dieser Prüfmethode sollten Labors die erforderliche technische Befähigung durch eine ordnungsgemäße Einstufung der elf in Tabelle 1 empfohlenen Stoffe nachweisen. Diese Stoffe wurden als repräsentativ für das gesamte Spektrum an Reaktionen mit schweren Augenschädigungen oder Augenreizungen nach den Ergebnissen von *In-vivo*-Kaninchenaugentests (TG 405) und nach der UN-GHS-/CLP-Klassifizierung ausgewählt (1). Weitere Auswahlkriterien waren die Verfügbarkeit der Stoffe im Handel sowie das Vorliegen hochwertiger *In-vivo*-Referenzdaten und hochwertiger *In-vitro*-Daten, die mit der Kurzzeit-Prüfmethode ermittelt wurden (3). Wenn ein dort genannter Stoff nicht verfügbar ist bzw. wenn dies gerechtfertigt ist, kann ein anderer Stoff verwendet werden, für den geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Referenzdaten verfügbar sind, sofern die hier beschriebenen Auswahlkriterien berücksichtigt werden.

Tabelle 1

Liste der Leistungsstoffe

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ⁽¹⁾	Aggregatzustand	<i>In-vivo</i> -UN-GHS-/CLP-Kat. ⁽²⁾	Lösungsmittel in der Kurzzeitprüfung	UN-GHS-/CLP-Kat. nach Kurzzeitexposition
Benzalkoniumchlorid (10 %, wässrig)	8001-54-5	Oniumverbindung	Flüssigkeit	Kategorie 1	Kochsalzlösung	Kategorie 1

⁽¹⁾ Im Juni 2013 kam die Gemeinsame Tagung überein, dass der Begriff „Prüfchemikalie“ zur Beschreibung des Prüfgegenstandes bei neuen und aktualisierten Prüfmethoden einheitlicher verwendet werden solle.

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ⁽¹⁾	Aggregatzustand	In-vivo-UN-GHS-/CLP-Kat. ⁽²⁾	Lösungsmittel in der Kurzzeitprüfung	UN-GHS-/CLP-Kat. nach Kurzzeitexposition
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	Flüssigkeit	Kategorie 1	Kochsalzlösung	Kategorie 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyclische Verbindung, Bromverbindung, Chlorverbindung	Feststoff	Kategorie 1	Kochsalzlösung	Kategorie 1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Lauge, anorganische Chemikalie	Feststoff	Kategorie 1 ⁽³⁾	Kochsalzlösung	Kategorie 1
Butyrolacton	96-48-0	Lacton, heterocyclische Verbindung	Flüssigkeit	Kategorie 2A (nach CLP Kategorie 2)	Kochsalzlösung	Keine Vorhersage möglich
1-Octanol	111-87-5	Alkohol	Flüssigkeit	Kategorie 2A/B ⁽⁴⁾ (nach CLP Kategorie 2)	Mineralöl	Keine Vorhersage möglich
Cyclopentanol	96-41-3	Alkohol, Kohlenwasserstoff, cyclisch	Flüssigkeit	Kategorie 2A/B ⁽⁵⁾ (nach CLP Kategorie 2)	Kochsalzlösung	Keine Vorhersage möglich
2-Ethoxyethylacetat	111-15-9	Alkohol, Ether	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Kochsalzlösung	Keine Einstufung
Dodecan	112-40-3	Kohlenwasserstoff (acyclisch)	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Mineralöl	Keine Einstufung
Methylisobutylketon	108-10-1	Keton	Flüssigkeit	Keine Einstufung	Mineralöl	Keine Einstufung

Stoff	CAS-Nr.	Chemikalienklasse ⁽¹⁾	Aggregatzustand	<i>In-vivo</i> -UN-GHS-/CLP-Kat. ⁽²⁾	Lösungsmittel in der Kurzzeitprüfung	UN-GHS-/CLP-Kat. nach Kurzzeitexposition
1,1-Dimethylguanidinsulfat	598-65-2	Amidin, Schwefelverbindung	Feststoff	Keine Einstufung	Kochsalzlösung	Keine Einstufung

⁽¹⁾ Chemikalienklassen wurden anhand von Informationen aus früheren NICEATM-Veröffentlichungen bzw., wenn diese nicht verfügbar waren, nach den Medical Subject Headings (MeSH[®]) der National Library of Medicine (über ChemIDplus[®] [National Library of Medicine], siehe <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) und nach Strukturbestimmungen des NICEATM vorgenommen.

⁽²⁾ Gestützt auf Ergebnisse aus dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) unter Berücksichtigung der UN-GHS-Klassifizierung (1).

⁽³⁾ Die Einstufung als Kategorie 1 beruht auf dem Hautreizungspotenzial von 100 % Natriumhydroxid (geführt als Leistungschemikalie mit Hautverätzungspotenzial in der OECD TG 435) und dem Kriterium für die Einstufung in die UN-GHS-/CLP-Kategorie 1 (1).

⁽⁴⁾ Die Einstufung in die Kategorien 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 2 von 6 gegenüber 4 von 6 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Der *In-vivo*-Datensatz umfasste 2 Untersuchungen mit jeweils 3 Versuchstieren. Bei einem Versuch zeigten sich bei zwei von drei Tieren Wirkungen an Tag 7, die eine Einstufung in Kategorie 2A rechtfertigten (11). Bei der zweiten Untersuchung gingen alle Endpunkte bei allen drei Tieren bis Tag 7 auf einen Wert von null zurück; daher wurde eine Einstufung in Kategorie 2B vorgenommen (12).

⁽⁵⁾ Die Einstufung in die Kategorie 2A oder 2B ist von der Auswertung der Kriterien des UN-GHS zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien abhängig, d. h. für eine Einstufung in die Kategorie 2A müssen an 1 von 3 gegenüber 2 von 3 Tieren Wirkungen an Tag 7 beobachtet werden. Die *In-vivo*-Studie umfasste drei Tiere. Alle Endpunkte mit Ausnahme einer Hornhauttrübung und einer Bindehautrötung bei einem Tier, gingen bis Tag 7 oder früher auf einen Wert von null zurück. Bei dem einen Tier, das sich bis Tag 7 nicht vollständig regeneriert hatte, wurden die Hornhauttrübung und die Bindehautrötung (an Tag 7) jeweils mit 1 bewertet. An Tag 11 waren die Trübung und die Rötung vollständig verschwunden.

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service

PRÜFVERFAHREN

Vorbereitung des Zellmonolayers

15. Die Kurzzeitprüfung sollte mit SRIC-Zellen (Kaninchen-Corneazellen des Statens Serum Institut) durchgeführt werden. Die SIRC-Zellen sollten aus einer gut qualifizierten Zellbank bezogen werden (z. B. American Type Culture Collection (ATCC), CCL 60).
16. SIRC-Zellen werden bei 37 °C in 5 % CO₂ in befeuchteter Atmosphäre in einem Kulturkolben mit einem Kulturmedium (d. h. Eagle's MEM) kultiviert, das mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 50-100 Einheiten/ml Penicillin und 50-100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Zellen, die sich im Kulturkolben konfluent entwickelt haben, sollten mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (ggf. unter Verwendung eines Zellschabers) abgenommen werden. Bevor sie für Routineprüfungen verwendet werden, sind die Zellen in einem Kulturkolben zu propagieren (z. B. mit 2 bis 3 Passagen); nach dem Auftauen sollten nicht mehr als 25 Passagen erfolgen.
17. Die für die Kurzzeitprüfung zu verwendende Zellen werden dann mit geeigneter Dichte präpariert und in 96-Well-Platten ausgesät. Zum Aussäen in einem Kulturvolumen von 200 µl wird eine Zelldichte von 6,0 × 10³ Zellen pro Well empfohlen, wenn die Zellen vier Tage nach dem Aussäen verwendet werden, bzw. 3,0 × 10³ Zellen bei Verwendung der Zellen fünf Tage nach dem Aussäen. Zellen, die zur Kurzzeitprüfung mit angemessener Dichte in ein Kulturmedium ausgesät wurden, erreichen zum Zeitpunkt der Prüfung (d. h. vier oder fünf Tage nach dem Aussäen) eine Konfluenz von mehr als 80 %.

Applikation der Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

18. Erste Wahl als Lösungsmittel zum Auflösen oder Suspendieren von Prüfchemikalien ist physiologische Kochsalzlösung. Wenn eine Prüfchemikalie nur schwach oder überhaupt nicht löslich ist oder in Kochsalzlösung nicht mindestens fünf Minuten gleichmäßig suspendiert wird, ist als zweite Wahl 5 % DMSO (CAS-Nr. 67-68-5) in Kochsalzlösung als Lösungsmittel zu verwenden. Bei Prüfchemikalien, die in Kochsalzlösung oder in 5 % DMSO in Kochsalzlösung nicht gelöst oder mindestens fünf Minuten gleichmäßig suspendiert werden, wird als dritte Wahl Mineralöl (CAS-Nr. 8042-47-5) als Lösungsmittel verwendet.
19. Die Prüfchemikalien werden im jeweils ausgewählten Lösungsmittel in einer Konzentration von 5 % (w/w) gelöst oder gleichmäßig suspendiert und anschließend in Verdünnungsreihen mit jeweils 10 Verdünnungen auf Konzentrationen von 0,5 % und 0,05 % verdünnt. Jede einzelne Prüfchemikalie ist in beiden Konzentrationen (5 % und 0,05 %) zu untersuchen. In der 96-Well-Platte kultivierte Zellen werden bei Raumtemperatur fünf Minuten pro Well mit 200 µl der Prüfchemikalienlösung (bzw. der Suspension) in Konzentrationen von 5 bzw. 0,05 % behandelt. Prüfchemikalien (einkomponentige oder mehrkomponentige Stoffe oder Gemische) werden je nach Methode unabhängig von ihrer tatsächlichen Reinheit als reine Stoffe betrachtet und verdünnt bzw. suspendiert.
20. Das in Nummer 16 beschriebene Kulturmedium wird bei jeder einzelnen Replikatplatte als Mediumkontrolle verwendet. Außerdem werden die Zellen auf jeder einzelnen Replikatplatte mit Proben der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Für die in Nummer 18 genannten Lösungsmittel wurde bestätigt, dass die Viabilität von SRIC-Zellen nicht beeinträchtigt wird.
21. Bei der Kurzzeit-Prüfmethode ist bei allen Replikatplatten 0,01 % Natriumlaurylsulfat (SLS) in Kochsalzlösung als Positivkontrolle zu verwenden. Zur Berechnung der Zellviabilität der Positivkontrolle muss jede Replikatplatte auch eine Kochsalzlösung als Kontrolle beinhalten.
22. Zur Bestimmung des Ausgleichs der optischen Dichte wird eine Blindkontrolle benötigt. Die Blindkontrolle ist in Wells zu prüfen, die ausschließlich calcium- und magnesiumfreien Phosphatpuffer oder Zellen enthalten.
23. Jede Probe (die Prüfchemikalie in Konzentrationen von > 5 % und 0,05 %, die Mediumkontrolle, die Lösungsmittelkontrolle und die Positivkontrolle) sollte bei jeder Wiederholung jeweils dreimal geprüft werden, indem die Zellen fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 200 µl der betreffenden Prüf- bzw. Kontrollchemikalie behandelt werden.
24. Referenzstoffe erleichtern die Evaluierung des augenreizenden Potenzials unbekannter Chemikalien einer bestimmten Chemikalien- oder Produktklasse und die Evaluierung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

Messung der Zellviabilität

25. Nach der Behandlung werden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen; anschließend werden 200 µl MTT-Lösung (0,5 mg MTT/ml Kulturmedium) zugesetzt. Nach einer zweistündigen Reaktionszeit in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) wird die MTT-Lösung dekantiert. Danach wird das MTT-Formazan unter Zugabe von 200 µl 0,04 n Salzsäure/Isopropanol 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur extrahiert. Darauf wird mit einem Platten-Lesegerät die Absorption der MTT-Formazan-Lösung bei 570 nm gemessen. Bei der MTT-Prüfung treten Interferenzen durch die Prüfchemikalien (aufgrund von Farbstoffen oder durch direkte MTT-Reduktionsmittel) nur dann auf, wenn nach dem Waschen im Anschluss an die Behandlung eine Prüfchemikalie noch in erheblichem Umfang im Prüfsystem enthalten ist. Dies ist etwa bei rekonstruiertem humanem 3D-Hornhaut- oder Epidermisgewebe der Fall. Für die bei der Kurzzeit-Prüfmethode verwendeten 2D-Zellkulturen sind diese Interferenzen jedoch nicht von Bedeutung.

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

26. Die für jede Prüfchemikalie ermittelten OD-Werte (OD = optische Dichte) werden anschließend zur Berechnung der prozentualen Viabilität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle herangezogen, die gleich 100 % gesetzt wird. Die relative Zellviabilität wird als Prozentanteil ausgedrückt. Dieser Prozentanteil wird durch Division der OD der Prüfchemikalie durch die OD der Lösungsmittelkontrolle ermittelt, nachdem von beiden Werten jeweils die OD der Blindkontrolle abgezogen wurde.

$$\text{Zellviabilität(\%)} = \frac{(\text{OD}_{570\text{Prüfchemikalie}}) - (\text{OD}_{570\text{Blindkontrolle}})}{(\text{OD}_{570\text{Lösungsmittelkontr.}}) - (\text{OD}_{570\text{Blindk.}})} \times 100$$

Ähnlich wird die relative Zellviabilität der einzelnen Lösungsmittelkontrollen als Prozentanteil ausgedrückt. Dieser Prozentanteil wird durch Division der OD der einzelnen Lösungsmittelkontrollen durch die OD der einzelnen Mediumkontrollen ermittelt, nachdem von beiden Werten jeweils die OD der Blindkontrolle abgezogen wurde.

27. Bei der Prüfung sollten drei unabhängige Wiederholungen jeweils mit drei Replikat-Wells (d. h. n = 9) durchgeführt werden. Das arithmetische Mittel der relativen Zellviabilität wird anhand des arithmetischen Mittels der drei Wells jeder einzelnen Prüfchemikalie und jeder einzelnen Lösungsmittelkontrolle der einzelnen unabhängigen Wiederholungen ermittelt. Das endgültige arithmetische Mittel der Zellviabilität wird anhand der drei unabhängigen Wiederholungen berechnet.
28. Die Schwellenwerte der Zellviabilität zur Identifizierung von schwer augenschädigenden Chemikalien (UN-GHS-/CLP-Kategorie 1) und von Chemikalien, die keine Einstufung als Augenreizend oder schwer augenschädigend erfordern (keine Einstufung nach UN GHS/CLP), sind nachfolgend aufgeführt:

Tabelle 2

Vorhersagemodell der Kurzzeit-Prüfmethode

Zellviabilität		UN-GHS-/CLP-Kategorie	Anwendbarkeit
5 %	0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Keine Einstufung	Stoffe und Gemische außer i) stark flüchtigen Stoffen mit Dampfdrücken über 6 kPa ⁽¹⁾ und ii) festen Chemikalien (Stoffen und Gemischen) mit Ausnahme von Tensiden und Gemischen, die ausschließlich Tenside enthalten
> 70 %	> 70 %	Keine Vorhersage möglich	Nicht anwendbar
> 70 %	> 70 %	Kategorie 1	Stoffe und Gemische ⁽²⁾

⁽¹⁾ Gemische mit Stoffen mit Dampfdrücken von über 6 kPa sollten mit besonderer Sorgfalt untersucht werden, damit Gefahren nicht unterschätzt werden. Ob die Verwendung der Kurzzeit-Prüfmethode in Betracht kommt, sollte daher auf Einzelfallbasis entschieden werden.

⁽²⁾ Je nach den vorwiegend mit einkomponentigen Stoffen ermittelten Ergebnissen, wenn auch begrenzte Daten zur Prüfung von Gemischen verfügbar sind. Die Prüfmethode ist dennoch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen technisch geeignet. Bevor diese Prüfmethode bei einem Gemisch angewendet wird, um zu rechtlichen Zwecken Daten zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

Akzeptanzkriterien

29. Die Prüfergebnisse sind annehmbar, wenn die folgenden Kriterien vollständig erfüllt sind:

- a) Die optische Dichte der (mit dem Kulturmedium behandelten) Mediumkontrolle nach Abzug der optischen Dichte der Blindkontrolle beträgt mindestens 0,3.

- b) Die Viabilität der Lösungsmittelkontrolle liegt bei mindestens 80 % der Viabilität der Mediumkontrolle. Wenn bei den Wiederholungen jeweils mehrere Lösungsmittelkontrollen verwendet werden, sind die Prüfchemikalien zur Untersuchung mit den betreffenden Lösungsmitteln nur dann geeignet, wenn die Zellviabilität der Lösungsmittelkontrollen jeweils mehr als 80 % beträgt.
- c) Die Zellviabilität der Positivkontrolle (0,01 % SLS) liegt im Bereich von zwei Standardabweichungen vom historischen Mittelwert. Die obere und die untere Akzeptanzgrenze der Positivkontrolle werden häufig aktualisiert (d. h. alle drei Monate bzw. in Labors, in denen die Prüfungen seltener durchgeführt werden (weniger als einmal pro Monat), immer dann, wenn eine akzeptable Prüfung durchgeführt wurde). Wenn Versuche in einem Labor nicht in hinreichender Anzahl durchgeführt werden, um eine statistisch robuste Verteilung der Positivkontrollen zu ermitteln, kann unter Berücksichtigung der vom Entwickler der Prüfmethode festgelegten oberen und unteren Grenzwerte (d. h. 21,1 % und 62,3 %, je nach den historischen Daten des betreffenden Labors) nach den ersten routinemäßigen Prüfungen eine interne Verteilung ermittelt werden.
- d) Die Standardabweichung der aus drei unabhängigen Wiederholungen ermittelten endgültigen Zellviabilität beträgt bei beiden Konzentrationen der Prüfchemikalie (5 % und 0,05 %) weniger als 15 %.

Wenn mindestens eines dieser Kriterien nicht erfüllt ist, sollten die Ergebnisse nicht berücksichtigt werden. In diesem Fall sind drei weitere unabhängige Wiederholungen durchzuführen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

30. Die Daten der einzelnen Wells (z. B. die Werte der Zellviabilität) der jeweiligen Wiederholungen sowie der Gesamtmittelwert, die Standardabweichung und die Einstufung sind anzugeben.

Prüfbericht

31. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalien und Kontrollstoffe

- Einkomponentige Stoffe: Chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung(en), CAS-Nummer(n), SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel und/oder andere Kennungen;
- mehrkomponentige Stoffe, UVCB-Stoffe und Gemische: Charakterisierung, so weit wie möglich, z. B. durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), Reinheit, das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe oben) der einzelnen Elemente, soweit verfügbar;
- Aggregatzustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, log P, Molekulargewicht, Chemikalienklasse und weitere für die Untersuchung relevante physikalische und chemische Eigenschaften, soweit verfügbar;
- Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.;
- Behandlung vor der Untersuchung, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen und Stabilität, soweit verfügbar.

Prüfbedingungen und -verfahren

- Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;
- Identifikation der verwendeten Prüfmethode;

- verwendete Zelllinie, Herkunft, Passagenzahl und Konfluenz der für die Untersuchung verwendeten Zellen;
- Details des angewandten Prüfverfahrens;
- Anzahl der Wiederholungen und verwendeten Replikate
- Konzentrationen der verwendeten Prüfchemikalie (falls von den Empfehlungen abweichend);
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels für jede Prüfchemikalie;
- Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie (falls von den Empfehlungen abweichend);
- Beschreibung etwaiger Änderungen am Prüfverfahren;
- Beschreibung der angewandten Bewertungs- und Entscheidungskriterien;
- Angabe des historischen Mittelwerts der Kontrollgruppe und der Standardabweichung (SD);
- Nachweis der Leistungsfähigkeit des Labors hinsichtlich der Durchführung der Prüfmethode (z. B. durch Prüfen von Leistungsstoffen) oder zum Nachweis der reproduzierbaren Durchführung der Prüfmethode im Zeitverlauf.

Ergebnisse

- Für alle Prüfchemikalien und Kontrollstoffe sowie für jede geprüfte Konzentration sind die einzelnen OD-Werte pro Replikat-Well, das arithmetische Mittel der OD-Werte der einzelnen unabhängigen Wiederholungen, die Zellviabilität der einzelnen unabhängigen Wiederholungen in % und das endgültige arithmetische Mittel der Zellviabilität in % sowie die Standardabweichung bei drei Wiederholung in einer Tabelle anzugeben;
- Ergebnisse der Medium-, der Lösungsmittel- und der Positivkontrolle als Nachweis für die Erfüllung geeigneter Akzeptanzkriterien;
- Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen;
- insgesamt abgeleitete Einstufung mit Bezug auf das Vorhersagemodell und/oder angewandte Entscheidungskriterien.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (1) Vereinte Nationen (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung) (GHS): fünfte überarbeitete Auflage, New York und Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Abrufbar unter:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott, L, u. a. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

- (3) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi, Y., u. a. (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (5) Sakaguchi, H., u. a. (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (6) Kojima, H., u. a. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, S. 1 855-1 869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Abrufbar unter: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Kapitel B.5 dieses Anhangs, Akute Augenreizung/-verätzung.
- (9) Saito, K, u. a. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen, T.J., Chrai, S.S., und Robinson. J.R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1 648-1 653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brüssel, Belgien.
- (12) Gautheron, P., u. a. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18, 442-449.
- (13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.

Anlage

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Augenreizung: Erzeugen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „reversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 2“.

Bottom-up-Ansatz: Schrittweiser Ansatz für eine Prüfchemikalie, von der vermutet wird, dass sie keine Einstufung als augenreizend oder schwer augenschädigend erfordert. Dabei werden zunächst Chemikalien, die keine Einstufung erfordern (negatives Ergebnis), von anderen Chemikalien (positives Ergebnis) unterschieden.

Chemikalie: Ein Stoff oder Gemisch.

Einkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens 80 % w/w vorliegt.

Falsch-Negativ-Rate: Der Anteil aller positiven Chemikalien, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Falsch-Positiv-Rate: Der Anteil aller negativen Chemikalien, die mit einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Indikator für die Leistungsfähigkeit einer Prüfmethode.

Gefahr: Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

Gemisch: Ein Gemisch oder eine Lösung, die aus zwei oder mehr Stoffen besteht.

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (13).

Gestufte Prüfstrategie: Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfchemikalie in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (weight-of-evidence) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahreinstufung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergegangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfchemikalie auf Basis der vorliegenden Informationen ermittelt werden kann, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Einstufung vorgenommen werden kann.

Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle: Eine unbehandelte Probe, die alle Elemente eines Prüfsystems enthält, einschließlich des mit der Prüfchemikalie behandelten Lösungsmittels oder Vehikels und anderer Kontrollproben, und die verwendet wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfchemikalie behandelten Proben zu bestimmen, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden. Bei der Prüfung mit einer gleichzeitigen Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Prüfsystem interagiert.

Mediumkontrolle: Ein unbehandeltes Replikat, das alle Elemente eines Prüfsystems enthält. Diese Probe wird mit einer Prüfchemikalie behandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Prüfsystem interagiert.

Mehrkomponentiger Stoff: Ein nach seiner quantitativen Zusammensetzung definierter Stoff, bei dem mehr als ein Hauptbestandteil in einer Konzentration von mindestens $\geq 10\%$ w/w und $< 80\%$ w/w vorhanden ist. Ein mehrkomponentiger Stoff ist das Ergebnis eines Herstellungsprozesses. Der Unterschied zwischen einem Gemisch und einem mehrkomponentigen Stoff besteht darin, dass ein Gemisch durch die Mischung von zwei oder mehr Stoffen ohne chemische Reaktion entsteht. Ein mehrkomponentiger Stoff wird durch eine chemische Reaktion gebildet.

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid.

OD: Optische Dichte.

Positivkontrolle: Ein Replikat, das alle Elemente eines Prüfsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Referenzstoff: Ein zum Vergleich mit einer Prüfchemikalie verwendeter Stoff. Referenzstoffe sollten die folgenden Eigenschaften haben: (i) einheitliche und zuverlässige Herkunft; (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen der Prüfmethode und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem mit einer Prüfung die untersuchte biologische Wirkung korrekt gemessen oder vorhersagt wird. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (10).

Schwere Augenschädigung: Erzeugen von Gewebeschäden im Auge oder eine schwerwiegende Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig reversibel sind. Synonym zu den Einstufungen „irreversible Wirkungen am Auge“ und „UN-GHS-/CLP-Kategorie 1“.

Sensitivität: Der Anteil aller positiven/wirkenden Chemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (10).

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Chemikalien, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (13).

Stoff: Ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können.

Tensid: Auch als oberflächenaktiver Stoff bezeichnet; Stoffe, wie waschaktive Stoffe (Detergenzien), die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit herabsetzen und so die Bildung von Schaum oder das Eindringen in feste Stoffe ermöglichen; auch bekannt als Netzmittel.

Top-down-Ansatz: Schrittweiser Ansatz bei einer Chemikalie, von der vermutet wird, dass sie schwere Augenschäden verursacht. Dabei werden zunächst Chemikalien, die schwere Augenschäden verursachen (positives Ergebnis), von anderen Chemikalien (negatives Ergebnis) unterschieden.

UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals = Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung der Vereinten Nationen): Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

UN-GHS/CLP-Kategorie 1: Siehe „Schwere Augenschädigung“.

UN-GHS/CLP-Kategorie 2: Siehe „Augenreizung“.

UN-GHS-/CLP-Kategorie Keine Einstufung: Chemikalien, die nicht in die UN-GHS-/CLP-Kategorien 1 oder 2 (oder die UN-GHS-Kategorien 2A oder 2B) eingestuft wurden.

UVCB: Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (13).