

Come comunicare dati *in vitro*
Guida pratica 1

Versione 1.1 – settembre 2012

ABC

AVVISO LEGALE

Le informazioni contenute nella presente guida pratica non costituiscono un parere legale e non rappresentano necessariamente in termini legali la posizione ufficiale dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche. L'Agenzia europea per le sostanze chimiche declina ogni responsabilità per quanto riguarda il contenuto del presente documento.

Clausola di esclusione dalla responsabilità: Questa è una traduzione di lavoro di un documento originariamente pubblicato in inglese. Il documento originale è disponibile sul sito web dell'ECHA.

Versione	Modifiche
1 - marzo 2010	Prima pubblicazione
1.1 - settembre 2012	

Guida pratica 1: Come comunicare dati in vitro

Riferimento: ECHA-10-B-04-IT

ISBN-13: 978-92-9217-753-9

ISSN: 1831-6727

Data di pubblicazione: 24/03/2010

Lingua: IT

© Agenzia europea per le sostanze chimiche, 2010.

Copertina © Agenzia europea per le sostanze chimiche

La riproduzione è autorizzata con citazione della fonte nella seguente forma "Fonte: Agenzia europea per le sostanze chimiche, <http://echa.europa.eu/>", e previa notifica scritta all'unità di comunicazione ECHA (publications@echa.europa.eu).

Il presente documento sarà disponibile nelle seguenti 22 lingue:

bulgaro, ceco, danese, olandese, inglese, estone, finlandese, francese, tedesco, greco, ungherese, italiano, lettone, lituano, maltese, polacco, portoghese, rumeno, slovacco, sloveno, spagnolo e svedese

Per inviare eventuali osservazioni o domande relative al presente documento, utilizzare il modulo per la richiesta di informazioni (riportando il riferimento e la data di pubblicazione). Il modulo per la richiesta di informazioni è reperibile alla pagina Contatti dell'ECHA all'indirizzo:

<http://echa.europa.eu/contact>

Agenzia europea per le sostanze chimiche

Indirizzo postale: P.O. Box 400, FI-00121 Helsinki, Finlandia

Indirizzo: Annankatu 18, Helsinki, Finlandia

Sommario

1. INTRODUZIONE	4
2. UTILIZZO DI METODI E DATI <i>IN VITRO</i> IN CONFORMITA' ALLE DISPOSIZIONI DEL REGOLAMENTO REACH	5
3. DOMANDE SULL'UTILIZZO E SULLA DOCUMENTAZIONE/PRESENTAZIONE DI DATI E METODI <i>IN VITRO</i> AI FINI DELLA REGISTRAZIONE SECONDO IL REGOLAMENTO REACH	6
3.1 Quali documenti di orientamento REACH devo leggere?	6
3.2 Come valutare e presentare l'adeguatezza e l'idoneità del metodo o di dati <i>in vitro</i> per un utilizzo conforme alle disposizioni del regolamento REACH?	6
3.3 I metodi e i dati <i>in vitro</i> possono essere utilizzati ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi?	6
3.4 Come utilizzare i metodi e i dati <i>in vitro</i> come parte dell'approccio basato sul peso dell'evidenza?.....	7
3.5 Come possono essere utilizzati dati <i>in vitro</i> nel metodo read-across e nella creazione di categorie?.....	7
3.6 Come presentare i metodi e i dati <i>in vitro</i> in IUCLID 5?	7
3.7 Come presentare l'uso di dati derivanti da sperimentazioni <i>in vitro</i> per soddisfare una prescrizione standard in materia di informazione per un test <i>in vivo</i>	8
4. ULTERIORI INFORMAZIONI	10
ALLEGATO 1: ESEMPI	11

1. INTRODUZIONE

Uno degli obiettivi principali del regolamento REACH (CE n. 1907/2006) consiste nel proteggere la salute dell'uomo e l'ambiente. A questo scopo sono necessarie informazioni adeguate sulle proprietà delle sostanze chimiche per prendere decisioni sulla classificazione e sull'etichettatura e/o sulla valutazione dei rischi.

I dichiaranti devono presentare informazioni ai fini della registrazione e della valutazione secondo quanto specificato negli allegati VI-XI del regolamento REACH.

Ai sensi dell'articolo 13, paragrafo 1 e dell'articolo 25, paragrafo 1, del regolamento REACH, è possibile produrre informazioni mediante mezzi diversi dai test, e l'utilizzo di animali vertebrati negli esperimenti deve essere effettuato solo in caso di assoluta necessità. In aggiunta, l'articolo 13, paragrafo 4, del regolamento REACH specifica che test e analisi ecotossicologici e tossicologici devono essere svolti in conformità con le disposizioni della direttiva 86/609/CEE.

Il regolamento REACH mira inoltre al miglioramento, alla riduzione e alla sostituzione di esperimenti su animali (strategia delle 3R) nonché alla promozione di metodi di sperimentazione alternativi (come secondo la direttiva 86/609/CEE). La direttiva del Consiglio 86/609/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici richiede il supporto dello sviluppo, della convalida e dell'accettazione di metodi che riducano, migliorino o sostituiscano l'utilizzo di animali da laboratorio.

Attraverso la promozione di metodi alternativi, diversi metodi di sperimentazione *in vitro* sono stati sottoposti alla convalida internazionale e sono accettati a fini legislativi. La convalida è il processo mediante il quale si stabilisce l'affidabilità e la pertinenza di una procedura per uno scopo specifico.

Nell'UE, il Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (European Centre for Validation of Alternative Methods - ECVAM) presso la Direzione generale Centro comune di ricerca (Directorate-General Joint Research Centre - DG JRC) è responsabile del coordinamento della convalida scientifica di nuovi metodi di sperimentazione alternativi. Nell'evoluzione di nuovi metodi di sperimentazione si identificano cinque fasi principali che comprendono lo sviluppo del test, la fase di preconvalida, la fase di convalida, la valutazione indipendente e, infine, l'avanzamento verso l'accettazione in termini di regolamentazione. Il processo di preconvalida è essenziale per assicurare che qualsiasi metodo compreso in uno studio di convalida formale soddisfi in maniera adeguata i criteri di inclusione definiti in tale studio.

I principi e i criteri di preconvalida e di convalida su come debbano essere svolti gli studi di convalida di nuovi metodi di sperimentazione o di metodi di sperimentazione aggiornati sono descritti nella Guida alle prescrizioni in materia d'informazione di REACH (R.4) e sono adottati dalla linea guida OCSE 34.

A causa della forte priorità data dalla UE all'adozione di metodi alternativi convalidati e pertinenti e dei vantaggi di coordinamento con il programma di linee guida dell'OCSE sulle sperimentazioni per garantire un'armonizzazione e un'accettazione globale, i progetti riguardanti metodi alternativi vengono di preferenza presentati al processo OCSE. Ciononostante, in caso d'indebito ritardo in tale forum o di necessità imminenti all'interno della UE, le attività relative all'adozione di un nuovo metodo alternativo possono essere condotte in parallelo o portate avanti unicamente nel processo UE. Se tale metodo viene successivamente approvato nell'OCSE, allora il metodo UE verrà aggiornato di conseguenza.

2. UTILIZZO DI METODI E DATI *IN VITRO* IN CONFORMITÀ ALLE DISPOSIZIONI DEL REGOLAMENTO REACH

I dati prodotti mediante metodi di sperimentazione *in vitro* possono essere utilizzati secondo il regolamento REACH a condizione che le informazioni per l'endpoint considerato siano sufficienti ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi. Tali dati possono essere utilizzati per sostituire completamente o parzialmente prescrizioni in materia di informazione che dovrebbero altrimenti essere prodotte con dati *in vivo*. Tuttavia, anche i dati *in vitro*, compresi quelli prodotti mediante metodi che non soddisfano criteri di convalida riconosciuti a livello internazionale (adeguatezza e idoneità), per un endpoint specifico, devono essere considerati e presentati nel fascicolo di registrazione come parte della raccolta di tutte le informazioni disponibili e utilizzati in un approccio basato sul peso dell'evidenza (allegato XI, punto 1.2) o per sostenere il raggruppamento di sostanze (allegato XI, punto 1.5).

Ci sono tre categorie di metodi e dati *in vitro* che possono essere utilizzate ai fini della registrazione di sostanze ai sensi del regolamento REACH, per la precisione metodi *in vitro* convalidati (adeguati), metodi *in vitro* preconvalidati (idonei), ma anche altri dati *in vitro* prodotti mediante l'utilizzo di metodi *in vitro* non preconvalidati.

Metodi *in vitro* convalidati

I metodi *in vitro* convalidati, dopo essere stati approvati scientificamente secondo principi di convalida riconosciuti a livello internazionale (R4 e OCSE GD 34), possono sostituire completamente o in parte un test *in vivo* a seconda della finalità per la quale il metodo è stato convalidato e adottato. Alcuni metodi di sperimentazione *in vitro* rientrano tra le informazioni standard richieste a diversi livelli di tonnellaggio (per esempio saggi *in vitro* per irritazione cutanea, saggi *in vitro* per valutare la mutagenicità). Questi sono metodi convalidati che hanno dato prova di essere adeguati e adatti per fornire informazioni da utilizzare ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi.

Metodi *in vitro* preconvalidati

I test *in vitro* che soddisfano i criteri di preconvalida riconosciuti a livello internazionale (R4 e OCSE GD 34) sono inoltre considerati adatti per l'utilizzo secondo il regolamento REACH quando i risultati derivanti da questi test indicano una certa proprietà pericolosa. Tuttavia, se i risultati derivanti da metodi preconvalidati non indicano una proprietà pericolosa (risultati negativi), questi devono essere confermati con il test pertinente specificato negli allegati da VII a X relativo all'endpoint corrispondente (allegato XI, punto 1.4). Quando vengono utilizzati dati derivanti da metodi *in vitro* preconvalidati, devono essere forniti nel fascicolo di registrazione i criteri ECVAM per entrare nella fase di preconvalida, inclusi la prova della riproducibilità del metodo, la relativa pertinenza meccanicistica e la capacità previsionale,.

Metodi *in vitro* non preconvalidati

In aggiunta, i metodi preconvalidati e altri dati *in vitro* (non preconvalidati) possono essere utilizzati nel contesto della raccolta di informazioni per fornire dati aggiuntivi per la valutazione e l'interpretazione di dati *in vivo* o *in vitro* all'interno della modalità/del meccanismo di azione (per esempio dati *in vitro* cinetici, tossicogenomica, metabolomica) e per sostenere l'adattamento del regime di sperimentazione standard come specificato nell'allegato XI (utilizzo di dati esistenti, metodo read-across e raggruppamento di sostanze chimiche, peso dell'evidenza). Tuttavia, in ciascun caso lo scopo dell'utilizzo di tali metodi nel fascicolo di registrazione deve essere chiaro, giustificato e ben documentato. Laddove applicabile (per esempio metodi preconvalidati utilizzati in qualità di prove di supporto) devono essere forniti i criteri di idoneità specificati nella guida.

3. DOMANDE SULL'UTILIZZO E SULLA DOCUMENTAZIONE/PRESENTAZIONE DI DATI E METODI *IN VITRO* AI FINI DELLA REGISTRAZIONE SECONDO IL REGOLAMENTO REACH

3.1 Quali documenti di orientamento REACH devo leggere?

La guida all'uso di metodi *in vitro* nell'ambito del regolamento REACH può essere trovata nella Guida alle prescrizioni in materia di informazione (capitolo R.4.3.1.1 Dati *in vitro*) nonché nella Guida per i requisiti d'informazione e per la valutazione della sicurezza chimica (R7a e R7b) per ciascun endpoint (eco)tossicologico.

3.2 Come valutare e presentare l'adeguatezza e l'idoneità del metodo o di dati *in vitro* per un utilizzo conforme alle disposizioni del regolamento REACH?

Quando un metodo di sperimentazione *in vitro* convalidato viene presentato nel fascicolo di registrazione, i criteri di qualità specificati nel protocollo CE o OCSE per il corrispondente end point devono essere valutati e presentati nel record di studio del pertinente endpoint di IUCLID. A condizione che il metodo sia elencato nel regolamento dei metodi di prova CE o nelle linee guida sulle sperimentazioni dell'OCSE, l'adeguatezza dell'utilizzo per un endpoint specifico è già stata valutata a livello internazionale e il metodo può essere utilizzato per sostituire completamente o in parte la sperimentazione su animali. Devono essere tenute in considerazione le restrizioni nel protocollo dei metodi di sperimentazione o nei documenti di guida tecnica (per esempio, alcuni metodi *in vitro* sono adeguati solo per la previsione di risultati positivi, quale l'indicazione di una proprietà pericolosa, ma non per risultati negativi).

Qualora un dichiarante voglia utilizzare metodi *in vitro* preconvalidati per soddisfare le prescrizioni in materia di informazione previste dal regolamento REACH, potrà farlo solo nelle condizioni specificate nell'allegato XI, punto 1.4. Nel fascicolo IUCLID trasmesso, deve essere valutata e presentata l'adeguatezza del metodo rispetto ai criteri ECVAM.

Per quanto riguarda l'utilizzo di tutti gli altri metodi *in vitro* che costituiscono parte degli aspetti qualitativi dell'approccio basato sul peso dell'evidenza del metodo, quali la pertinenza del materiale utilizzato per il test, la pertinenza biologica, gli standard qualitativi (riproducibilità dei risultati del test) devono essere valutati e inclusi nel fascicolo IUCLID all'interno del record di studio degli endpoint.

3.3 I metodi e i dati *in vitro* possono essere utilizzati ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi?

Solo metodi *in vitro* convalidati e preconvalidati possono essere utilizzati in condizioni specifiche ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi. Se è stato utilizzato un metodo *in vitro* convalidato che è elencato negli allegati da VII a X, oppure un metodo di sperimentazione preconvalidato che indica le proprietà pericolose di una sostanza, i risultati possono essere considerati adeguati ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi. Altri dati *in vitro* possono essere utilizzati solo come parte dell'approccio basato sul peso dell'evidenza per sostenere il processo decisionale.

3.4 Come utilizzare i metodi e i dati *in vitro* come parte dell'approccio basato sul peso dell'evidenza?

Le informazioni prodotte utilizzando i metodi *in vitro* possono essere utili per fornire prove aggiuntive che aiutino a spiegare i risultati di test *in vivo*. In particolare, dati metabolici e cinetici prodotti *in vitro* possono agevolare l'identificazione della modalità di azione se combinati con dati derivanti da test *in vivo* e inoltre aiutare lo sviluppo di modelli cinetici.

Metodologie avanzate come la tossicogenomica possono inoltre fornire informazioni relative alla valutazione dei rischi e agevolare il processo decisionale durante la progettazione di strategie di sperimentazione efficienti ed efficaci nonché fornire la base meccanicistica per considerare la modalità di azione, la pertinenza biologica degli effetti osservati in studi *in vivo* e la loro rilevanza per l'uomo.

Quando i dati *in vitro* sono utilizzati nel fascicolo di registrazione come parte dell'approccio basato sul peso dell'evidenza (weight of evidence - "WoE"), si devono seguire gli orientamenti forniti nella Guida pratica 2 sull'utilizzo del peso dell'evidenza (Practical Guide 2 How to report weight of evidence). In particolare, i dati devono essere presentati in modo sufficientemente dettagliato per consentire la valutazione della pertinenza nella valutazione dei rischi, e la pertinenza di tali dati per il caso particolare deve essere ben documentata e presentata nel fascicolo di registrazione.

3.5 Come possono essere utilizzati dati *in vitro* nel metodo read-across e nella creazione di categorie?

I dati prodotti con metodi di prova *in vitro* possono essere utilizzati per riempire lacune quando si utilizza il metodo read-across a partire da sostanze simili o il raggruppamento di sostanze chimiche. In tali casi, i dati *in vitro* possono fornire delucidazioni su considerazioni meccanicistiche e favorire una maggiore esaustività del metodo read-across nel contesto di prodotti metabolici comuni a partire dalle sostanze simili (utilizzo di profiling metabolico). In aggiunta, possono essere anche utilizzati dati *in vitro* per dimostrare il valore biologico della "terminologia meccanicistica" utilizzata in modelli (Q)SAR, per esempio per favorire la definizione del campo di applicabilità di un modello (Q)SAR.

3.6 Come presentare i metodi e i dati *in vitro* in IUCLID 5?

Quando vengono utilizzati metodi *in vitro* convalidati in un fascicolo di registrazione per soddisfare prescrizioni del regolamento REACH, il sommario esauriente di studio (Robust Study Summary - "RSS") o il sommario di studio (study summary) deve essere fornito nel fascicolo IUCLID. In questo caso devono essere seguite la Guida pratica sul Sommario esauriente di studio (Practical Guide 3: How to report robust study summaries) e la guida IUCLID (IUCLID 5 Manuale dell'utente finale) ed è necessaria una descrizione esaustiva delle condizioni, dei risultati e dell'interpretazione del test ai fini del processo decisionale relativo alla classificazione e all'etichettatura e/o alla valutazione dei rischi.

Se i risultati di un metodo *in vitro* preconvalidato sono presentati come studio chiave allo scopo di soddisfare le prescrizioni relative ai dati di un endpoint specifico, la pertinenza del metodo deve essere chiara. In aggiunta alle prescrizioni in materia di RSS (si veda la Practical Guide 3: How to report robust study summaries e il Manuale dell'utente finale IUCLID), nel fascicolo di registrazione è necessario includere la documentazione di conformità ai criteri per la valutazione di idoneità secondo i criteri ECVAM per valutare l'idoneità del metodo e la sua potenziale accettazione ai fini della classificazione ed etichettatura e/o della valutazione dei rischi. Bisogna ricordare in questo caso che, se i risultati derivanti da tali metodi non indicano certe proprietà pericolose per l'endpoint specifico preso in considerazione, il test pertinente deve essere

condotto per confermare i risultati negativi tranne se la sperimentazione può essere omessa secondo i regolamenti specifici e generali per l'adattamento del regime di sperimentazione standard (allegati da VII a XI).

Se i risultati derivanti da un metodo *in vitro* preconvalidato o da un metodo *in vitro* non preconvalidato sono presentati come studi di supporto o come parte dell'approccio basato sul peso dell'evidenza o come studi di poca importanza, questo deve essere chiaramente indicato e giustificato nel fascicolo di registrazione utilizzando i campi IUCLID pertinenti nei record di studio degli endpoint. Maggiori informazioni circa l'utilizzo di informazioni in un approccio basato sul peso dell'evidenza sono inoltre fornite nella Guida pratica 2 per il peso dell'evidenza (Practical Guide 2: How to report weight of evidence). Nel caso dell'utilizzo di tali informazioni all'interno del peso dell'evidenza, nel formato IUCLID per sommari esaustivi di studio devono essere forniti dettagli di contesto sul metodo. Inoltre, la pertinenza dei risultati dello studio o degli studi in relazione alle conclusioni ricavate dall'insieme di dati generale deve essere documentata in modo dettagliato. In aggiunta, altri studi possono inoltre richiedere descrizioni dettagliate se potenzialmente pertinenti. In particolare, per studi invalidati, ma che indicano risultati critici, devono essere inoltre preparati sommari esaustivi di studio che evidenzino la debolezza degli studi. Tali studi possono essere indicati come "studi di poca importanza" nel campo "Purpose flag" in IUCLID.

3.7 Come presentare l'uso di dati derivanti da sperimentazioni *in vitro* per soddisfare una prescrizione standard in materia di informazione per un test *in vivo*

Per alcuni endpoint un dichiarante può fornire informazioni derivanti da sperimentazioni *in vitro* per soddisfare una prescrizione in materia di informazione che, altrimenti, dovrebbe essere soddisfatta mediante dati provenienti da un test *in vivo*. I dati ottenuti da uno studio sull'irritazione cutanea condotto *in vivo*, ad esempio, costituiscono una prescrizione standard in materia di informazione per una sostanza registrata a 10 o più tonnellate all'anno (allegati da VIII a X del regolamento REACH). In questo caso, un dichiarante può giustificare il fatto che i dati derivanti da adeguate sperimentazioni *in vitro* per l'irritazione e/o la corrosione cutanea, che possono essere state condotte nell'ambito di una strategia integrata di sperimentazione, soddisfano le norme specifiche (colonna 2 degli allegati da VII a X) o generali (allegato XI) per l'adattamento del regime di sperimentazione standard. In futuro è possibile che saranno sviluppati ulteriori approcci comprendenti l'utilizzo di batterie di sperimentazioni *in vitro* per valutare in modo adeguato altri endpoint, ad esempio la sensibilizzazione cutanea, dove è possibile stabilire il potenziale di sensibilizzazione cutanea di una sostanza nell'ambito di una strategia di sperimentazione utilizzando un approccio basato sul peso dell'evidenza attraverso una batteria di metodi di sperimentazione *in vitro*.

Nello scenario descritto in precedenza, la giustificazione per l'adattamento del regime di sperimentazione standard deve essere presentata nel fascicolo di registrazione. Pertanto, oltre all'RSS creato per gli studi *in vitro* (cfr. la precedente sezione 3.6), un dichiarante dovrà creare e in parte completare un record di studio degli endpoint all'interno del fascicolo IUCLID per la rispettiva prescrizione *in vivo* in materia di informazione. In assenza di ciò, la presentazione del fascicolo non supererà il controllo di completezza tecnica (Technical Completeness Check – TCC) e non sarà possibile presentare con successo il proprio fascicolo di registrazione.

Per completare il record di studio degli endpoint *in vivo* i dichiaranti devono selezionare un "purpose flag" (identificatore di finalità) dalla deroga ai dati che può essere, ad esempio, "studio scientificamente ingiustificato" o "altra giustificazione". Una motivazione più dettagliata deve essere inserita nel campo "Giustificazione per la deroga ai dati". La giustificazione si baserà sui dettagli del caso basandosi, ad esempio, sui criteri specificati all'allegato XI, sezione 1.4, come gli studi adeguati *in vitro*.

Informazioni utili sull'uso dei dati *in vitro* possono essere tratte dal webinar per i dichiaranti capofila, tenutosi il 29 febbraio 2012 e intitolato "How to use *in vitro* data to fulfil REACH information requirements" (Come utilizzare dati *in vitro* per soddisfare le prescrizioni in materia di informazione stabilite dal REACH (http://echa.europa.eu/web/guest/view-article/-/journal_content/7def3c04-4b2b-4cfd-86d0-5ce36797faa8)).

4. ULTERIORI INFORMAZIONI

Guida pratica 3: How to report robust study summaries (Come presentare sommari esaustivi di studio)

http://echa.europa.eu/documents/10162/13643/pg_report_robust_study_summaries_en.pdf

Guida pratica 2: How to report weight of evidence (Come presentare il peso dell'evidenza)

http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_weight_of_evidence_en.pdf

Sistema di ricerca per la revisione, la convalida e l'approvazione di metodi di prova alternativi (Tracking System for alternative test methods review - TSAR) della DG JRC

<http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>

TSAR è uno strumento atto a fornire una visione trasparente dello stato di metodi alternativi man mano che progrediscono da protocolli puramente scientifici presentati per la preconvalida a essere attivamente utilizzati in un contesto di regolamentazione.

Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (European Centre for the Validation of Alternative Methods - ECVAM)

<http://ecvam.jrc.it/>

Sperimentazione di sostanze chimiche OCSE - Linee guida

http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html

Regolamento CE dei metodi di prova

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0739:EN:PDF>

Manuale dell'utente finale IUC 5

<http://iuclid.echa.europa.eu/index.php?fuseaction=home.documentation&type=public>

Allegato 1: Esempi

L'allegato 1 comprende esempi illustrativi su come compilare un record di studio degli end point in IUCLID quando:

1. un metodo di sperimentazione *in vitro* convalidato viene utilizzato come studio chiave
2. un metodo di sperimentazione *in vitro* preconvalidato viene utilizzato come studio chiave
3. un metodo di sperimentazione *in vitro* non preconvalidato viene utilizzato come studio di supporto

1. Metodo di sperimentazione *in vitro* convalidato utilizzato come studio chiave

Administrative Data

Purpose flag: key study robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving:

Justification for data waiving:

Study result type: experimental result Study period: From 22 to 28 August, 2009

Reliability: 1 (reliable without restriction)

Rationale for reliability incl. deficiencies: GLP, Guideline study

Data source

Reference

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic s...	Testing laborat...	Report no.	Owner company	Company study...	Report date
study report	Mustermann	2009	In vitro Skin Irritation: Human Skin Model		testing Laboratory	1234567			2009-09-12

Add... Edit... Delete Move up Move down Select Insert

Data access: data submitter is data owner

Data protection claimed: yes, but willing to share

Materials and methods

Type of method: in vitro

Test guideline

Qualifier	Guideline	Deviations
according to	other guideline: EU Method B.46 (Skin Irritation)	no

Add... Edit... Delete Move up Move down

Principles of method if other than guideline:

GLP compliance: yes

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across): yes

Test materials

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number	123456-78-9

Details on test material

- State the analytical purity of the substance
 - Lot/Batch number with expiration date

Test system

Type of coverage

Preparation of test site

Vehicle

unchanged (no vehicle)

Amount/concentration applied

10 ul applied to each tissue. Spread to match tissue size.

Duration of treatment / exposure

15 min

Observation period

Number of animals

Not applicable

Details on study design

Any other information on materials and methods incl. tables

State here how the test was performed and what were the test conditions e.g.
 - positive and negative controls
 - test/incubation conditions
 - how many parallel samples
 - how was the relative viability of the tissue calculated and used for classification

For the current test, an irritation potential of a test item according to EU classification R38 is predicted if the mean relative tissue viability of three individual tissues is reduced below 50% of the negative control.

<i>In vitro</i> result	<i>In vivo</i> prediction
Mean tissue viability <50%	Irritant , R38
Mean tissue viability > 50%	Non-irritant

The absolute OD 570 nm of the negative control tissues in the MTT test is an indicator of tissue viability obtained after the shipping and storing procedure and under specific conditions of the assay. Tissue viability meets the acceptance criterion if the mean OD of the two tissues is ≥ 0.6 . An assay meets the acceptance criterion if mean relative tissue viability of the Positive Control is $\geq 40\%$.

Results and discussions

Irritation / corrosion results

Irritation parameter	Basis	Time point	Score	Max. score	Reversibility	Remarks
other: Absorbance (570 nm)	mean	10 min	1.02	1.07	no data	

Irritant/corrosive response data

State here the relevant information of the results.

Any other information on results incl. tables

Dose group	Treatment interval	Absorbance 570 nm Tissue 1	Absorbance 570 nm Tissue 2	Absorbance 570 nm Tissue 3	Mean Absorbance of 3 Tissues	Rel. Absorbance [% of Negative control]
Negative control	15 min	1.2	1.5	1.2	1.3	100.00
Positive control	15 min	0.3	0.3	0.3	0.3	23.1
Test substance	15 min	0.85	1.05	0.95	0.95	73.1

Optical evaluation of the MTT-reducing capacity of the test item after 1 hour incubation with MTT-reagent did not show blue colour.

The decrease in relative absorbance values noted for the test substance was well below the threshold for irritancy of relative absorbance=50%. Therefore the test substance is not considered to posses an irritant potential.

Applicant's summary and conclusion

Interpretation of results
not irritating

Criteria used for interpretation of results

Conclusions
Under the experimental conditions of this study, test substance is considered to be non-irritant to skin.

Executive summary

State here a brief description of the method, the results and the conclusions.

2. Metodo di sperimentazione *in vitro* preconvalidato utilizzato come studio chiave

Si noti che se si vuole utilizzare dati di sensibilizzazione cutanea *in vitro* come studio chiave, allo scopo di superare il controllo della completezza tecnica (Technical Completeness Check - TCC), è necessario fornire un ulteriore record di studio dell'endpoint aggiuntivo per la rinuncia ai test *in vivo* con una giustificazione, come mostrato nell'esempio che segue (allegato VII, punto 8.3, colonna 2).

Rinuncia

Administrative Data

Purpose flag robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving other justification

Justification for data waiving Annex X1 1.4. We have provided the results from an *in vitro* study which covers the skin sensitisation endpoint. The method used is currently under validation process.

Study result type Study period

Reliability

Rationale for reliability incl. deficiencies

Studio chiave

Administrative Data

Purpose flag: key study robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving:

Justification for data waiving:

Study result type: experimental result Study period: April 2009

Reliability: 2 (reliable with restrictions)

Rationale for reliability incl. deficiencies: GLP, test method is under validation.

Data source

Reference

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic s...	Testing laborat...	Report no.	Owner company	Company study...	Report date
study report	Mustermann	2009	In vitro skin sensitisation		Testing Laboratory	123456			2009-11-30

Add... Edit... Delete Move up Move down Select Insert

Data access: data submitter is data owner

Materials and methods

Type of method: in vitro

Type of study: other:

Test guideline

Qualifier	Guideline	Deviations
according to	other guideline: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) according publication X	no

Add... Edit... Delete Move up Move down

Principles of method if other than guideline

The method is based on the increase of CD86 and CD54 expression on THP-1 cell line. Both of these surface molecules are involved in lekocyte recruitment and activation. Expression is measured by Flow Cytometry.

GLP compliance: yes

Test materials

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across): no

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number	123456-78-9

Add... Edit... Delete Move up Move down

Details on test material

If the test material is not completely the same as the registered substance, then you need to give here the details of the test material e.g.

- molecular formula (of other than the submission substance)
- purity of the substance
- Lot/Batch No.

LLNA

Vehicle

Concentration

State here the concentrations used in test system with justifications. The chemical should be used at a subtoxic concentrations

No. of animals per dose

THP-1 cell culture is used instead of animals.

Details on study design (LLNA)

Positive control substance(s)

other: positive control used e.g. DNCB

Any other information on materials and methods incl. tables

Protocol:

- Pre-culture of THP-1 cells for 48 h or 72 h
- Seed and culture at the final cell count/well with chemical being tested with 3 different concentration for 24 h or 48 h in 24 well plate
- Divide test samples in to 3 groups
- Treat cells with blockin agent for 15 min on ice to avoid non specific binding and wash the cells
- Stain cells with appropriate anti-CD86, anti-CD54 and IgG antibodies for 30 min on ice
- Wash the cells and resuspend them in to PBS and add PI
- Flow-cytometric analysis

The results are calculated using MFI (mean fluorescence intensity)

MFI of chemical treated cells - MFI of chemical treated isotype control cells
MFI of vehicle control cells- MFI of vehicle isotype control cells

Clear positive results could be 2 to 3-fold greater than the control value.

Any other information on results incl. tables

Please give here the results of a given test incl. positive and negative control values. Tabular form with all parallel values including mean values would be appreciated.

Applicant's summary and conclusion

Interpretation of results

sensitising

Conclusions

Give here your conclusions.

3. Metodo di sperimentazione in vitro non preconvalidato utilizzato come studio di supporto
(IUCLID sezione 7.1.1. Tossicocinetica di base)

Administrative Data

Purpose flag: supporting study robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving:

Justification for data waiving:

Study result type: experimental result Study period: April 2009

Reliability: 2 (reliable with restrictions)

Rationale for reliability incl. deficiencies: peer reviewed publication

Data source

Reference

Reference type	Author	Year	Title	Bibliographic s...	Testing laborat...	Report no.	Owner company	Company study...	Report date
publication	Mustermann et al	2009	In vitro liver cell metabolism of chemical A	In vitro cell Biology Journal			N/A		

Add... Edit... Delete Move up Move down Select Insert

Data access: data published

Materials and methods

Type of method: in vitro

Objective of study

metabolism

Test guideline

Qualifier	Guideline	Deviations
no guideline followed		

Add... Edit... Delete Move up Move down

Principles of method if other than guideline

Explain here the principle of the method e.g. Measurements of the induced activities of Cytochrome P450 isozymes in the presence of SUBSTANCE A by using PICM-19H cell line.

GLP compliance: yes

Identity of test material same as for substance defined in section 1 (if not read-across)

yes

Test material identity

Identifier	Identity
CAS number	12345-67-8

Add... Edit... Delete Move up Move down

Radiolabelling: no

Test materials

Details on test material

Provide details on test material based on the information available.

Confidential details on test material

Species: other: PICM-19 cell line

Administration / exposure

Route of administration
other:

Vehicle
unchanged (no vehicle)

Details on exposure

Duration and frequency of treatment / exposure
Provide information on cell culture and reagents (including sources)

Doses / concentrations
provide information on the preparation of doses, and the actual concentrations tested.

Any other information on materials and methods incl. tables

Provide information on the assays employed in the study, giving the basis of the assay and description of the procedure followed.

State here the detailed protocol of a method used e.g.

- cell culture conditions and reagents used e.g. the passage number
- exposure doses and duration exposure
- cell viability assay e.g. plate reader and what was the wave length used
- Induction of CYP450 e.g. how were the cells treated
- Assay of induced phase I and II activities e.g. treatment time, how were the samples analysed (wave length measured etc.)
- Protein determination (how it was measured)
- LC-MS e.g. how the samples were treated before measurement, what were the measurement conditions etc.)
- any other relevant information on test conditions

Information

Information Modification history Access Consultation Attachments Annotations Validation

In vitro Cell Biology Vol1 p. 25-28.doc / 23.5 KB

Remarks

Metabolite characterisation studies

Metabolites identified
yes


Details on metabolites
Provide details on the metabolites formed, the analytical techniques for detection, statistical methods, quality criteria if available.

Any other information on results incl. tables

Provide available tables here with the results obtained from the study.

Overall remarks, attachments

Overall remarks








Normal Arial 10 A B I U

Provide an evaluation of the findings of the study including their relevance to the toxicological profile of the registered substance.

Under the section Illustration (picture/graph) you can upload graphs of the results if available.

Attached background material

Attached document	Remarks
 Add...  Edit...  Delete  Move up  Move down	

Attached full study report






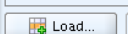


Attached full study report
 Add...  Edit...  Delete  Move up  Move down

Illustration (picture/graph)

 Load...  Zoom...  Delete

Applicant's summary and conclusion


Interpretation of results

other:

Conclusions

Provide conclusions on the findings of the study.

Executive summary



Normal Agency FB 8 A B I U

Cross-reference to other study

Report the studies where the information from this study summary can be used: e.g. Repeated dose toxicity study.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY
ANNANKATU 18, P.O. BOX 400,
FI-00121 HELSINKI, FINLANDIA
ECHA.EUROPA.EU