

Kuidas esitada *in vitro* katsete andmeid? 1. praktiline juhend

Version 1.1 – september 2012

ABC

ÕIGUSTEAVE

Käesolev dokument on REACH-määruse juhend, mis selgitab REACH-määrusest tulenevaid kohustusi ja nende täitmist. Ainus autentne õiguslik alus on REACH-määrus ja käesolev dokument ei ole õiguslikult samaväärne teave. Euroopa Kemikaaliamet ei võta mingit vastutust seoses käesoleva dokumendi sisuga.

Vastutamatusesäte. See on algselt inglise keeles avaldatud dokumendi tõlke töövariant. Algdokument on ECHA veebilehel.

Versioon	Muudatused
1 – märts 2010	Esimene väljaanne
1.1 – september 2012	

1. praktiline juhend. Kuidas esitada *in vitro* katsete andmeid?

Viide: ECHA-10-B-04.1-ET

ISBN-13: 978-92-9217-755-3

ISSN: 1831-6565

Avaldamiskuupäev: september 2012

Keel: ET

© Euroopa Kemikaaliamet, 2012

Esikaas © Euroopa Kemikaaliamet

Reprodutseerimine on lubatud allikale viitamisel, lisades viite „Allikas: Euroopa Kemikaaliamet, <http://echa.europa.eu/>” ja saates avaldamise kohta kirjaliku teate ECHA teabetalitusele (publications@echa.europa.eu).

Dokument avaldatakse 22 keeles:

bulgaaria, eesti, hispaania, hollandi, inglise, itaalia, kreeka, leedu, läti, malta, poola, portugali, prantsuse, rootsi, rumeenia, saksa, slovaki, sloveeni, soome, taani, tšehhi ja ungari keeles.

Kui teil tekib käesoleva dokumendiga seoses küsimusi või tähelepanekuid, saate need esitada teabenõude vormil (märkige ülalesitatud viide ja väljaandmise kuupäev). Teabenõude vorm on ECHA veebilehel kontaktandmete jaotises: <http://echa.europa.eu/contact>

Euroopa Kemikaaliamet

Postiaadress: P.O. Box 400, FI-00121 Helsinki, Soome

Külastusaadress: Annankatu 18, Helsinki, Soome

Sisukord

1. SISSEJUHATUS	4
2. <i>IN VITRO</i> MEETODITE JA ANDMETE KASUTAMINE REACH-MÄÄRUSE JÄRGI	5
3. <i>IN VITRO</i> ANDMETE JA MEETODITE KASUTAMINE, DOKUMENTEERIMINE JA ESITAMINE REACH-REGISTREERIMISEL	6
3.1 Mis REACH-juhendeid tuleks lugeda?	6
3.2 Kuidas hinnata ja esitada teavet <i>in vitro</i> meetodi ja andmete adekvaatsuse ning sobivuse kohta REACH-määruse järgi kasutamiseks?	6
3.3 Kas <i>in vitro</i> meetodeid ja andmeid saab kasutada klassifitseerimise ja märgistuse ja/või riskihindamise eesmärgil?	6
3.4 Kuidas kasutada <i>in vitro</i> meetodeid ja andmeid tõendite kaalukuse osana?	6
3.5 Kuidas kasutada <i>in vitro</i> andmeid analoogmeetodi ja kemikaalikategooriate rakendamisel?	7
3.6 Kuidas esitada <i>in vitro</i> meetodeid ja andmeid IUCLID 5-s?	7
3.7 Kuidas teatada <i>in vitro</i> katseandmete kasutamisest, et täita <i>in vivo</i> katsete teabe standardnõuded?	8
4. LISATEAVE	9
1. LISA. NÄITED	10

1. SISSEJUHATUS

Üks REACH-määruse ((EÜ) nr 1907/2006) põhieesmärke on kaitsta inimest ja keskkonda. Selle saavutamiseks on vaja piisavat teavet kemikaalide omaduste kohta, mille alusel neid klassifitseerida ja märgistada ja/või nende riske hinnata.

Registreerijad peavad esitama registreerimise ja hindamise jaoks REACH-määruse VI–XI lisas sätestatud andmed.

REACH-määruse artikli 13 lõike 1 ja artikli 25 lõike 1 järgi võib ainete omaduste teavet koguda mittekatseliste vahenditega ja selgroogsete loomadega tehakse katseid ainult viimase abinõuna. Samuti sätestab REACH-määruse artikli 13 lõige 4, et ökotoksikoloogilised ning toksikoloogilised katsed ja analüüsid tuleb teha kooskõlas direktiivi 86/609/EMÜ sätetega.

REACH-määrus taotleb ka loomkatsete täiustamist, vähendamist ja asendamist (3R-strateegia – *Refinement, Reduction, Replacement*), samuti alternatiivsete katsemeetodite propageerimist (vastavalt direktiivile 86/609/EMÜ). Nõukogu direktiiv 86/609/EMÜ katseteks ja muudel teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitsega seotud liikmesriikide õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta nõuab tuge selliste meetodite arendamisele, rakendamisele ning valideerimisele, mis võimaldaksid vähendada, täiustada ja asendada loomkatseid.

Alternatiivsete meetodite propageerimise raames on rahvusvaheliselt valideeritud ja saanud heakskiidu regulatiivseks kasutamiseks mitu *in vitro* katsemeetodit. Valideerimine on protsess, mille abil määratakse kindlaks menetluse usaldusväarsus ja asjakohasus teatud otstarbeks.

Euroopa Liidus vastutab uute alternatiivsete katsemeetodite teadusliku valideerimise koordineerimise eest Euroopa Komisjoni Teadusuuringute Ühiskeskuse (JRC) juures asuv Euroopa Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Keskus (ECVAM). Uute katsemeetodite väljatöötamisel on viis põhietappi: katsete arendamine, eelvalideerimine, valideerimine, sõltumatu hindamine ja liikumine regulatiivse heakskiidu poole. Eelvalideerimine on äärmiselt oluline, et tagada formaalsesse valideerimisuringusse võetava meetodi adekvaatne vastavus uuringu kohaldatavuskriteeriumidele.

Eelvalideerimise ning valideerimise põhimõtteid ja uute või uuendatud katsemeetodite valideerimisuringute tegemise põhimõtteid kirjeldatakse teabele esitatavate nõuete REACH-juhendis (peatükk R.4) ning on üle võetud OECD 34. suunistest.

Seoses olulisusega, mille Euroopa Liit on andnud valideeritud ja asjakohaste alternatiivmeetodite vastuvõtmisele ning OECD katsesuuniste programmiga kooskõlastamise eelistele ülemaailmse ühtlustamise ja heakskiidu tagamiseks, tuleb alternatiivsete meetoditega seotud projekte eelistatavalt käidelda OECD-menetluse järgi. Selle foorumi asjakohatu viivituse või Euroopa Liidu tungiva vajaduse korral võib uue alternatiivmeetodi vastuvõtmisega seotud tegevus toimuda paralleelselt või vahetult üksnes Euroopa Liidu protsessi raames. Kui meetod kooskõlastatakse hiljem OECDga, uuendatakse vastavalt ka Euroopa Liidu meetodit.

2. IN VITRO MEETODITE JA ANDMETE KASUTAMINE REACH-MÄÄRUSE JÄRGI

In vitro katsemeetoditega saadud andmeid võib REACH-määruse järgi kasutada tingimusel, et vaadeldava näitaja teave on klassifitseerimise ning märgistamise ja/või riskihindamise jaoks piisav. Selliseid andmeid võib kasutada nõutavate teabeelementide täielikuks või osaliseks asendamiseks, mis tuleb vastasel korral koostada *in vivo* andmete põhjal. *In vitro* andmeid, sealhulgas konkreetse näitaja jaoks rahvusvaheliselt valideeritud valideerimiskriteeriumidele (andmete adekvaatsus ja sobivus) mittevastavate meetodite abil saadud andmeid tuleb siiski samuti arvestada ning esitada registreerimistoimikus kogu olemasoleva teabe hulgas, kasutades neid tõendite kaalukuse hindamisel (XI lisa jaotis 1.2) või ainete rühmitamise toetuseks (XI lisa jaotis 1.5).

In vitro meetodeid ja andmeid on kolm klassi, mida saab kasutada ainete REACH-registreerimisel – valideeritud *in vitro* meetodid (adekvaatsed), eelvalideeritud *in vitro* meetodid (sobivad) ja muud *in vitro* andmed, mis on saadud eelvalideerimata *in vitro* meetodite abil.

a. Valideeritud *in vitro* meetodid

Valideeritud *in vitro* meetodid, mis on teaduslikult valideeritud vastavalt rahvusvahelistele valideerimispõhimõtetele (R.4 ja OECD 34. suunis), võivad *in vivo* katset täielikult või osaliselt asendada olenevalt otstarbest, mille jaoks meetod on valideeritud ja heaks kiidetud. Mõni *in vitro* katsemeetod kuulub teatud kogusevahemiku korral nõutava standardteabe hulka (nt nahaärrituse ja mutageensuse hindamise *in vitro* katsed). Need on valideeritud meetodid, mis on tõestatud adekvaatseteks ja sobivateks teabe esitamisel klassifitseerimise ning märgistuse ja/või riskihindamise eesmärgil.

b. Eelvalideeritud *in vitro* meetodid

In vitro katseid, mis vastavad rahvusvaheliselt kokkulepitud eelvalideerimiskriteeriumidele (R.4 ja OECD 34. suunis), käsitatakse samuti sobivatena kasutamiseks REACH-määruse järgi, kui nende katsete tulemused osutavad teatud ohtlikule omadusele. Kui aga eelvalideeritud meetodi tulemused ei näita ohtlikku omadust (tulemused on negatiivsed), tuleb need näitaja jaoks kinnitada VII–X lisas kirjeldatud asjakohase katsega (XI lisa jaotis 1.4). Eelvalideeritud *in vitro* meetoditega saadud andmete kasutamisel tuleb registreerimistoimikus märkida eelvalideerimisfaasi sisenemise ECVAM-kriteeriumid, sealhulgas meetodi korratavuse andmed, meetodi mehhanistlik asjakohasus ja prognoositavus.

c. Eelvalideerimata *in vitro* meetodid

Teabe kogumisel saab kasutada ka eelvalideeritud meetodeid ja muid *in vitro* andmeid (eelvalideerimata), et hankida täiendavaid andmeid *in vivo* või *in vitro* andmete hindamiseks ja tõlgendamiseks osana toimeviisi/mehhanismi andmetest (nt *in vitro* andmete kineetika, toksikogenoomika, metabooloomika) ning toetada standardse katserežiimi kohandamist vastavalt XI lisale (olemasolevate andmete kasutamine, analoog- ja rühmitamismeetod, tõendite kaalukus). Iga juhtumi korral peab selliste meetodite kasutamise eesmärk olema registreerimistoimikus selge, põhjendatud ja hästi dokumenteeritud. Vajaduse korral (nt eelvalideeritud meetodite kasutamisel täiendavate andmetena) tuleb lisada juhendis märgitud sobivuskriteeriumid.

3. *IN VITRO* ANDMETE JA MEETODITE KASUTAMINE, DOKUMENTEERIMINE JA ESITAMINE REACH-REGISTREERIMISEL

3.1 Mis REACH-juhendeid tuleks lugeda?

In vitro meetodite REACH-määruse kontekstis kasutamise juhised on teabele esitatavate nõuete juhendis (ptk R.4.3.1.1 „*In vitro* andmed“), samuti iga (öko)toksikoloogilise näitaja jaoks teabele esitatavate nõuete ja kemikaaliohutuse hindamise juhendis (ptk R.7a ja R.7b).

3.2 Kuidas hinnata ja esitada teavet *in vitro* meetodi ja andmete adekvaatsuse ning sobivuse kohta REACH-määruse järgi kasutamiseks?

Valideeritud *in vitro* katsemeetodi esitamisel registreerimistoimikus tuleb näitaja kohta EÜ või OECD protokollis sätestatud kvaliteedikriteeriume hinnata ja esitada asjakohase näitaja uuringukirjena IUCLIDis. Kui meetod on loetletud EÜ katsemeetodite määruses või OECD katsesuunises, on andmete adekvaatsust selle konkreetse näitaja jaoks juba hinnatud rahvusvahelisel tasemel ja meetodit võib kasutada loomkatsete täielikuks või osaliseks asendamiseks. Arvestada tuleb katsemeetodi protokollis või tehnilistes juhendites kirjeldatud piiranguid (nt mõni *in vitro* meetod on adekvaatne üksnes positiivsete tulemuste prognoosimiseks (st ohtliku omaduse näitamiseks), kuid mitte negatiivsete tulemuste korral).

Kui registreerija soovib kasutada eelvalideeritud *in vitro* meetodit REACH-määruse teabenõuete täitmiseks, võib seda teha ainult XI lisa jaotises 1.4 sätestatud tingimustel. Meetodi sobivust ECVAM-kriteeriumidega tuleb hinnata ja esitada IUCLID-toimikus.

Kõigi muude *in vitro* meetodite kasutamisel tõendite kaalukuse osana tuleb hinnata meetodi kvaliteediküsimusi, nagu katsematerjali asjakohasus, bioloogiline asjakohasus ja kvaliteedistandardid (katsetulemuste korratavus), ning lisada IUCLID-toimikusse näitaja uuringukirje osana.

3.3 Kas *in vitro* meetodeid ja andmeid saab kasutada klassifitseerimise ja märgistuse ja/või riskihindamise eesmärgil?

Klassifitseerimise ja märgistuse ja/või riskihindamise eesmärgil tohib kasutada ainult valideeritud ja eelvalideeritud *in vitro* meetodeid teatud kindlatel tingimustel. VII–X lisa loetletud valideeritud *in vitro* meetodi või aine ohtlike omadusi näitava eelvalideeritud meetodi kasutamisel võib tulemusi pidada klassifitseerimise ja märgistuse ja/või riskihindamise eesmärgil adekvaatseteks. Muid *in vitro* andmeid võib kasutada üksnes tõendite kaalukuse osana otsustamise toetamiseks.

3.4 Kuidas kasutada *in vitro* meetodeid ja andmeid tõendite kaalukuse osana?

In vitro meetodite abil hangitav teave võib olla kasulik täiendava tõendina, mis aitab selgitada *in vivo* katsetel saadud tulemusi. Eriti võivad *in vitro* katsetega saadud metabolismi ja kineetika andmed olla abiks toimeviisi tuvastamisel, kui neid kombineeritakse *in vivo* katsetest saadud andmetega, samuti saab neid rakendada kineetikamudelite väljatöötamisel.

Nüüdisaegsed meetodid, näiteks toksikogenoomika, võivad samuti olla teabeallikaks riski

hindamisel ning aidata tõhusa ja efektiivse katsestrateegia üle otsustamisel, samuti pakkuda mehhanistliku alust toimeviisi, *in vivo* uuringutes tuvastatud mõju bioloogilise olulisuse ja inimestele suunatud mõju väljaselgitamisel.

In vitro andmete kasutamisel registreerimistoimikus tõendite kaalukuse osana tuleb järgida 2. praktilist juhendit „Kuidas esitada tõendite kaalukust?“. Andmed tuleb esitada piisavalt detailselt, et eelkõige võimaldada hinnata riskihindamise asjakohasust; andmete asjakohasus konkreetse juhtumi kohta peab olema registreerimistoimikus hästi dokumenteeritud ja esitatud.

3.5 Kuidas kasutada *in vitro* andmeid analoogmeetodi ja kemikaalikategooriate rakendamisel?

In vitro katsemeetoditega saadud andmeid võib kasutada andmelünga täitmiseks, kui esitatakse sarnastest ainetest analoog- või rühmitamismeetodiga saadud andmeid. Sellisel juhul võivad *in vitro* andmed selgitada mehhanistlikke kaalutlusi ja aidata suurendada analoogmeetodi usaldusväärsust sarnaste ainete ühiste metaboliitide teabe leidmisel.

Peale selle võib *in vitro* andmeid kasutada ka (Q)SAR-mudelites rakendatava nn mehhanistliku terminoloogia bioloogilise väärtuse demonstreerimiseks, näiteks mudeli rakendatavusala määratlemisel.

3.6 Kuidas esitada *in vitro* meetodeid ja andmeid IUCLID 5-s?

Valideeritud *in vitro* meetodite kasutamisel registreerimistoimikus REACH-määruse nõuete täitmiseks tuleb esitada IUCLID-toimikus uuringuaruande kokkuvõtte või uuringu kokkuvõtte. Sel juhul tuleb järgida 3. praktilist juhendit „Kuidas esitada uuringuaruannete kokkuvõtteid?“ ja IUCLID 5 lõppkasutaja juhendit; nõutav on katsetingimuste, tulemuste ja tõlgenduse piisav kirjeldus, mille alusel saab otsustada klassifitseerimise ja märgistuse ja/või riskihindamise.

Eelvalideeritud *in vitro* meetodi tulemuste esitamisel kindla näitaja kohta võtmeuuringuna andmenõuete täitmiseks peab meetodi asjakohasus olema täiesti selge. Peale 3. praktilise juhendi „Kuidas esitada uuringuaruannete kokkuvõtteid?“ ja IUCLIDi lõppkasutaja juhendi nõuete tuleb registreerimistoimikusse lisada ka dokumendid ECVAM-kriteeriumidele vastavuse hinnangu kohta, et hinnata meetodi sobivust ja potentsiaalset kasutuselevõttu klassifitseerimisel ja märgistamisel ja/või riskihindamisel. Sellisel juhul tuleb meenutada, et kui selliste meetodite tulemused ei näita kindla näitaja kohta teatud ohtlikke omadusi, tuleb negatiivsed tulemused kinnitada asjakohase katsega, v.a kui katsetamisest võib loobuda vastavalt standardse katsetamiskorra kohandamise eri- ja üldeeskirjadele (VII–XI lisa).

Kui eelvalideeritud *in vitro* meetodi või eelvalideerimata *in vitro* meetodi tulemused esitatakse lisauuringuna või tõendite kaalukuse osana või kõrvalejäetud uuringuna, tuleb sellele registreerimistoimikus selgelt osutada ning põhjendada seda IUCLIDi näitaja uuringu kirje vastavatel väljadel. Tõendite kaalukuse andmete kasutamise lisateave on ka 2. praktilises juhendis „Kuidas esitada tõendite kaalukust?“. Sellise teabe kasutamisel tuleb uuringuaruande kokkuvõtte IUCLID-vormingus esitada tõendite kaalukuse meetodi kohta selle meetodi andmed. Üksikasjalikult tuleb dokumenteerida ka uuringu(te)l leitud teabe asjakohasus seoses üldise andmestiku alusel tehtavate järeldustega. Lisaks võivad üksikasjalikku kirjeldust nõuda ka muud tõenäoliselt olulise tähtsusega uuringud – näiteks tuleb puudulike uuringute kohta, kuid mis näitavad kriitilisi tulemusi, koostada samuti uuringuaruannete kokkuvõtted, tuues esile uuringute puudused. Selliseid uuringuid võib nimetada kõrvalejäetud uuringuteks ja märkida sellistena IUCLIDi eesmärgilipu väljal (*Purpose flag*).

3.7 Kuidas teatada *in vitro* katseandmete kasutamisest, et täita *in vivo* katsete teabe standardnõuded?

Mõne näitaja korral saab registreerija esitada *in vitro* katsetest saadud teabe, et täita nõue, mille korral tuleks muidu esitada *in vivo* katse andmed – näiteks koguses vähemalt 10 tonni aastas registreeritavate ainete korral on teabe standardnõuete hulgas nahaärrituse *in vivo* uuringu andmed (REACH-määruse VIII–X lisa). Selle näite korral saab registreerija tõendada, et tervikliku katsestrateegia osana toimuda võinud nahaärrituse- ja/või söövituse asjakohaste *in vitro* katsete andmed vastavad standardse katsetamiskorra kohandamise eri- (VII–X lisa 2. veerg) või üldeeskirjadele (XI lisa). Tulevikus töötatakse tõenäoliselt välja veel lähenemisviise, millega saab *in vitro* katsesarjadega hinnata ka muid näitajaid, näiteks naha ülitundlikkuse korral võib olla võimalik määrata aine toimet tekitada naha ülitundlikkust, kasutades mitme *in vitro* katsemeetodiga tõendite kaalukuse lähenemisviisi.

Sellise stsenaariumi korral tuleb registreerimistoimikus esitada standardse katsetamiskorra kohandamise põhjendus. Registreerijal on seetõttu vaja peale *in vitro* uuringute uuringuaruande (vt eespool jaotis 3.6) IUCLID-toimikus koostada ja osaliselt täita vastava *in vivo* teabele esitatava nõude kohta ka näitaja uuringu kirje. Vastasel korral ei läbi esitatav toimik tehnilise terviklikkuse kontrolli ja registreerimistoimikut ei saa esitada.

In vivo näitaja uuringu kirje täitmiseks tuleb registreerijal valida andmete esitamisest loobumise põhjenduste seast eesmärgilipp, näiteks „uuring ei ole teaduslikult põhjendatud“ (*study scientifically unjustified*) või „muu põhjendus“ (*other justification*). Üksikasjalik põhjendus tuleb sisestada andmete esitamisest loobumise põhjenduse väljale (*Justification for data waiving*). Põhjendus oleneb konkreetsest juhtumist, näiteks võib kinnitada esitatud *in vitro* uuringuandmete vastavust XI lisa punkti 1.4 kriteeriumidele.

In vitro katseandmete kasutamist käsitleti juhtregistreerijate 29. veebruari 2012 veebiseminaril „Kuidas kasutada in vitro andmeid REACH-teabe nõuete täitmiseks“ (http://echa.europa.eu/et/view-article/-/journal_content/7def3c04-4b2b-4cfd-86d0-5ce36797faa8).

4. LISATEAVE

3. praktiline juhend. Kuidas esitada uuringuaruannete kokkuvõtteid?

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

2. praktiline juhend. Kuidas esitada tõendite kaalukust?

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

Euroopa Komisjoni Teadusuuringute Ühiskeskuse (JRC) alternatiivsete katsemeetodite ülevaatus, valideerimise ja kinnitamise järgimissüsteem (TSAR)

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

TSAR on vahend, millega antakse selge ülevaade alternatiivmeetodite seisundi kohta nende muutumisel eelvalideerimiseks esitatud puhteaduslikest protokollidest aktiivse kasutamiseni regulatiivkontekstis.

Euroopa Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Keskus (ECVAM) <http://ecvam.jrc.it/>

OECD kemikaalide katsesuunised

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

EÜ katsemeetodite määrus

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

IUCLID 5 lõppkasutaja juhend

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

1. lisa. Näited

1. lisas on illustratiivsed näited, kuidas täita IUCLIDI näitaja uuringu kirje järgmistel katsemeetodite kasutusjuhtudel:

1. Valideeritud *in vitro* katsemeetod võtmeuuringuna
2. Eelvalideeritud *in vitro* katsemeetod võtmeuuringuna
3. Eelvalideerimata *in vitro* katsemeetod lisauuringuna

1. Valideeritud *in vitro* katsemeetod võtmeuuringuna

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 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

data access: data submitter is data owner

Data protection claimed: yes, but willing to share

Materials and methods

Type of method: in vitro

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

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

Results after the treatment with the test substance

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 possess 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. Eelvalideeritud *in vitro* katsemeetod võtmeuringuna

NB! Kui soovite kasutada võtmeuringuna naha sensibiliseerimise *in vitro* andmeid, peate tehnilise terviklikkuse kontrolli läbimiseks esitada näitaja täiendava uuringukirje *in vivo* nõutava standardteabe esitamisest loobumise kohta koos põhjendusega, nagu on tehtud järgmises näites (VII lisa, jaotis 8.3, 2. veerg).

Nõutava standardteabe esitamisest loobumine

Administrative Data

Purpose flag robust study summary used for classification used for MSDS

Data waiving other justification

Justification for data waiving Annex XI 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

Võtmeuring

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

No. of animals per dose

Details on study design (LLNA)

Positive control substance(s)

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

Conclusions

3. Eelvalideerimata *in vitro* katsemeetod lisauuringuna (IUCLID, jaotis 7.1.1 „Toksikokineetika põhiandmed“)

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 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		

Data access: data published

Materials and methods

Type of method: in vitro

Objective of study: metabolism

Test guideline: no guideline followed

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: CAS number 12345-67-8

Radiolabelling: no

Test materials

Details on test material: Provide details on test material based on the information available.

Confidential details on test material:

Test animals

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






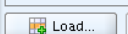


 Add...  Edit...  Delete  Move up  Move down

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.

EUROOPA KEMIKAALIAMET
ANNANKATU 18, P.O. BOX 400,
FI-00121 HELSINKI, SOOME
ECHA.EUROPA.EU