

Dansk udgave

Retsforskrifter

Indhold

I *Retsakter hvis offentliggørelse er obligatorisk*

- ★ **Kommissionens direktiv 2000/32/EF af 19. maj 2000 om 26. tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer⁽¹⁾** 1
 - ★ **Kommissionens direktiv 2000/33/EF af 25. april 2000 om 27. tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer⁽¹⁾** 90
-

II *Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk*

Kommissionen

2000/368/EF:

- ★ **Kommissionens beslutning af 19. maj 2000 om berigtigelse af direktiv 98/98/EF om femogtyvende tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer⁽¹⁾ (meddelt under nummer K(2000) 1333)** 108

Pris: 24,50 EUR

⁽¹⁾ EØS-relevant tekst.

DA

De akter, hvis titel er trykt med magre typer, er løbende retsakter inden for landbrugspolitikken og har normalt en begrænset gyldighedsperiode.

Titlen på alle øvrige akter er trykt med fede typer efter en asterisk.

I

(Retsakter hvis offentliggørelse er obligatorisk)

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2000/32/EF

af 19. maj 2000

om 26. tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer (*)

(EØS-relevant tekst)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer ⁽¹⁾, senest ændret ved Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/33/EF ⁽²⁾, særlig artikel 28, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Bilag I til direktiv 67/548/EØF indeholder en liste over farlige stoffer samt retningslinjer for de enkelte stoffers klassificering og etikettering; den nuværende videnskabelige og tekniske viden viser, at listen over farlige stoffer i nævnte bilag bør tilpasses; i nogle af direktivets sprogversioner bør der foretages ændringer i bestemte afsnit i forordet til og i tabel A i bilag I.

(2) Bilag III til direktiv 67/548/EØF indeholder en liste over sætninger, som angiver hvilke særlige farer, der er forbundet med de farlige stoffer og præparater; bilag IV til direktiv 67/548/EØF indeholder en liste over sætninger, som angiver forsigtighedsregler for farlige stoffer og præparater; bilag VI til direktiv 67/548/EØF indeholder kriterier for klassificering og etikettering af farlige stoffer og præparater; i nogle af direktivets sprogversioner bør der foretages ændringer i bestemte afsnit i bilag III, IV og VI.

(3) Bilag V til direktiv 67/548/EØF indeholder metoderne til bestemmelse af stoffers og præparaters fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet; det er nødvendigt at tilpasse dette bilag til den tekniske udvikling.

(*) Udstedt efter den 27. tilpasning.

⁽¹⁾ EFT 196 af 16.8.1967, s. 1.

⁽²⁾ EFT L 199 af 30.7.1999, s. 57.

(4) Bilag IX til direktiv 67/548/EØF indeholder bestemmelserne om børnesikrede lukninger; disse bestemmelser bør tilpasses og ajourføres; det er nødvendigt at udvide anvendelsesområdet for børnesikrede lukninger.

(5) De i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for Tilpasning til den Tekniske Udvikling af Direktiverne om Fjernelse af Tekniske Hindringer for Handelen med Farlige Stoffer og Præparater —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

I direktiv 67/548/EØF foretages følgende ændringer:

1) Bilag I ændres således:

- a) Note Q i bilag 1A til dette direktiv erstatter den tilsvarende note i forordet.
- b) Rækkerne i bilag 1B til dette direktiv erstatter de tilsvarende rækker i tabel A.
- c) Stofferne i bilag 1C til dette direktiv erstatter de tilsvarende stoffer.
- d) Stofferne i bilag 1D til dette direktiv indsættes.

2) Risikosætningen i bilag 2 til dette direktiv erstatter den tilsvarende sætning i bilag III.

3) Bilag IV ændres således:

- a) Sikkerhedssætningerne i bilag 3A til dette direktiv erstatter de tilsvarende sætninger i bilag IV.

- b) De kombinerede sikkerhedssætninger i bilag 3B til dette direktiv erstatter de tilsvarende sætninger i bilag IV.
- 4) Del B i bilag V ændres således:
- a) Bilag 4A til dette direktiv erstatter kapitel B.10.
 - b) Bilag 4B til dette direktiv erstatter kapitel B.11.
 - c) Bilag 4C til dette direktiv erstatter kapitel B.12.
 - d) Bilag 4D til dette direktiv erstatter kapitel B.13 og B.14.
 - e) Bilag 4E til dette direktiv erstatter kapitel B.17.
 - f) Bilag 4F til dette direktiv erstatter kapitel B.23. Overskriften til kapitel B.23 i den forklarende bemærkning ændres tilsvarende.
 - g) Bilag 4G til dette direktiv tilføjes.
- 5) Fjerde led i den generelle indledning til del C i bilag V udgår.
- 6) Bilag 5 til dette direktiv erstatter den tilsvarende tekst i bilag VI.
- 7) Bilag IX ændres som anført i bilag 6 til dette direktiv.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne gennemfører senest den 1. juni 2001 de love og administrative bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv. Medlemsstaterne underretter straks Kommissionen herom.

Disse love og bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen de vigtigste nationale lovbestemmelser, som de vedtager på det område, der er omfattet af dette direktiv og en sammenligningstabel mellem dette direktiv og de vedtagne nationale bestemmelser.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tredjedagen for dets offentliggørelse i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 19. maj 2000.

På Kommissionens vegne
Margot WALLSTRÖM
Medlem af Kommissionen

BILAG 1A

FORORD TIL BILAG I

Forklaring på noterne vedrørende identificering, klassificering og etikettering af stoffer

DA:

Note Q:

Klassificeringen som kræftfremkaldende kan udelades for fibre, som opfylder en af følgende betingelser:

- en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage
- en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage
- en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller
- en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

Ämnet behöver inte klassificeras som cancerframkallande om det kan visas att det uppfyller ett av följande villkor:

- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar
- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar
- ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet
- frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DE version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

BILAG 1B

TABEL A

Z	Symbol	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
»18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργό	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon«
»64	Gd	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολίμιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium«

BILAG 1C

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
006-011-00-7	carbaryl (ISO) 1-naphthylmethylcarbamat		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	metam-natrium (ISO) metam-Na natrium-N-methyldithiocarbamat		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuron (ISO)		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoxur (ISO) 2-isopropoxyphenylmethylcarbamat		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	aldicarb (ISO) 2-methyl-2-(methylthio) propionaldehyd- O-(methylcarbamoyle) oxim		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminocarb (ISO) 4-dimethylamino-3-tolylmethylcarbamat		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	di-allat (ISO) S-2,3-dichlorallyldiisopropylthiocarbamat		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barban (ISO) 4-chlorbut-2-ynyl-3-chlorphenylcarbamat		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	mercaptodimethur (ISO) methiocarb 4-methylthio-3,5-xylylmethylcarbamat methio- carb		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proxan-Na (ISO) natrium-isopropyl-xanthogenat		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
006-026-00-9	carbofuran (ISO) 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ylmethylcarbammat		216-353-0	1563-66-2	T+: R26/28 N: R50-53	T; N R: 26/28-50/53 S: (1/2)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobuton (ISO) 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenylisopropylcarbonat		213-546-1	973-21-7	T; R25 N: R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)37-45-60-61		
006-029-00-5	dioxacarb (ISO) 2-(1,3-dioxolan-2-yl)phenylmethylcarbammat		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N: R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2)37-45-61		
006-033-00-7	metoxuron (ISO) N'-(3-chlor-4-methoxyphenyl)-N,N-dimethylurinstof		243-433-2	19937-59-8	N: R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulat (ISO) S-propylbutyl(ethyl)thiocarbamat		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N: R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2)23-61		
006-035-00-8	pirimicarb (ISO) 2-dimethylamino-5,6-dimethylpyrimidin-4-yl-dimethylcarbammat		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N: R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promecarb (ISO) 5-isopropyl-3-tolylmethylcarbammat		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N: R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfallat (ISO) 2-chlorallyldiethylthiocarbamat	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N: R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	tri-allet (ISO) S-2,3,3-trichlorallyldiisopropylthiocarbamat		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N: R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2)24-37-60-61		
006-042-00-6	monuron (ISO) 3-(4-chlorphenyl)-1,1-dimethylurinstof		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N: R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		
006-043-00-1	monuron-TCA 3-(4-chlorphenyl)-1,1-dimethyluroniumtrichloracetat		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N: R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
006-045-00-2	methomyl (ISO) 1-methylthioethylidenaminmethylcarbammat		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiocarb (ISO) 2,2-dimethyl-1,3-benzodioxol-4-ylmethylcarbammat		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufencarb (ISO) 3-(1-methylbutyl)phenylmethylcarbammat-3-(1-ethylpropyl)phenylmethylcarbammat (3:1)		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	ethiofencarb (ISO) 2-ethylthiomethylphenylmethylcarbammat		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-050-00-X	fenuron-TCA 1,1-dimethylphenyluroniumtrichloracetat		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	isoprocarb (ISO) o-cumenylmethylcarbammat		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	mexacarb (ISO) 4-dimethylamino-3,5-xylylmethylcarbammat		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapyrin (ISO) 2-chlor-6-trichlormethylpyridin		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	oxycarboxin (ISO) 5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathiin-3-carboxanilid-4,4-dioxid		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	thiophanat-methyl (ISO)		245-740-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	furmecyclox N-cyclohexyl-N-methoxy-2,5-dimethyl-3-furamid		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
006-088-00-7	benfuracarb (ISO)		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-3)36/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-dimethylhydrazin	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	1,2-dimethylhydrazin	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25%: T; R45-23/24/25 3% ≤ C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% ≤ C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	hydrogenfluorid, opløsning ... % flussyre ... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-7)9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	azinphos-methyl (ISO) O,O-dimethyl-4-oxobenzotriazin-3- ylmethylthiophosphat		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-2)28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fenthion (ISO) O,O-dimethyl-O-(4-methylthio-m- tolyl)thiophosphat		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-3)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinphos-ethyl (ISO) O,O-diethyl-4-oxobenzotriazin-3- ylmethylthiophosphat		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-2)28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazophos (ISO) O,O-diethyl-O-1-phenyl-1,2,4-triazol- 3-ylthiophosphat		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-3)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	svovdichlorid		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-2)6-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etiketkering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
016-014-00-5	svovltetrachlorid		—	13451-08-6	R14 C: R34 N: R50	C: N R: 14-34-50 S: (1/2-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	dimethylsulfat	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C: R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0,1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	dimexano (ISO) Bis(methoxy-thiocarbonyl)-disulfid		215-993-8	1468-37-7	Xn: R22 N: R50-53	Xn: N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
016-071-00-6	trinatrium-3-amino-6,13-dichlor-10-((3-((4-chlor-6-(2-sulfonatophenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)propyl)amino)-4,11-triphenoxydioxazindisulfonat		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
022-001-00-5	titantetrachlorid titan (IV) chlorid		231-441-9	7550-45-0	R14 C: R34	C R: 14-34 S: (1/2-7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	dimethylzink [1] diethylzink [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F: R17 C: R34 N: R50-53	F: C: N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-16-43-45-60-61		
050-002-00-0	cyhexatin (ISO) tricyclohexylhydroxystannan		236-049-1	13121-70-5	Xn: R20/21/22 N: R50-53	Xn: N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-13-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
050-012-00-5	tetracyclohexylstannan [1] chlortricyclohexylstannan [2] butyltricyclohexylstannan [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-26-28-60-61	C ≥ 1%; Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	fenbutatin-oxid (ISO) bis(tris(2-methyl-2-phenylpropyl)rim)-oxid		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2)-28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	blysulfochromatgul (Denne forbindelse identificeres i Colour Index ved Colour Index Constitution Number, C.I. 77603.)		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	blychromatmolybdatulfarød (Denne forbindelse identificeres i Colour Index ved Colour Index Constitution Number, C.I. 77605.)		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	cumen [1] propylbenzen [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2)-24-37-61-62		4
601-032-00-3	benzo[<i>a</i>]pyren benzo[<i>def</i>]chrysen		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	benz[<i>e</i>]acephenanthrylen		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-dichlorbenzen para-dichlorbenzen		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2)-24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-iodpropen allyliodid		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2)-7-26-45		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
603-076-00-9	but-2-in-1,4-diol 2-butyln-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2)-26-36/37/39-45	C ≥ 50%: T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%: T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%: Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%: Xn; R20/22	
603-091-00-0	exo-1-methyl-4-(1-methylethyl)-7-oxabicyclo [2.2.1]heptan-2-ol		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2)-26		
603-093-00-1	exo-(+)-1-methyl-4-(1-methylethyl)-2-[(2-met- hylphenyl)methoxy]-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2)-23-61		
603-097-00-3	1,1',1''-nitrotripropan-2-ol		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2)-26-61		
603-117-00-0	propan-2-ol isopropylalkohol		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2)-7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	biphenyl-2-ol 2-hydroxybiphenyl		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2)-22-61		
604-021-00-1	natriumbiphenyl-2-yloxid		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2)-22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-isobutylethylidendiphenol		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	acfluorfen [1] acfluorfen-natrium [2] 5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-nitro- benzoesyre [1] natrium-5-[2-chlor-4-(trifluormethyl) pheno- xy]-2-nitrobenzoat [2]	256-634-5 [1] 263-560-7 [2]		50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2)-24-39-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
604-043-00-1	monobenzon		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mequimol		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	glyoxal ... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10%: Xn; R20-36/38-40-43 1% ≤ C < 10%: Xn; R40-43	
606-016-00-X	pindon (ISO) 2-pivaloylindan-1,3-dion		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	dichlon (ISO) 2,3-dichlor-1,4-naphthoquinon		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	chlordecon (ISO) decachlorpentaacyclo[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}] decan-4-on		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	metribuzin (ISO) 4-amino-6-tert-butyl-3-methylthio-1,2,4- triazin-5-on		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	chloridazon (ISO) 5-amino-4-chlor-2-phenylpyridazin-3-on pyrazon		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	chinomethionat (ISO) 6-methyl-1,3-dithiolo(4,5-b)quinoxalin-2-on		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/ 53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	triadimefon (ISO) 1-(4-chlorphenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1,2,4-tria- zol-1-yl)butanon		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
606-044-00-2	2,4,6-trimethylbenzophenon		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	dicamba (ISO) 3,6-dichlor-2-methoxybenzoesyre		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	coumachlor (ISO) 3-(1-(4-chlorphenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxycoumarin		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	coumafuryl (ISO) 4-hydroxy-3-[3-oxo-1-(2-furyl)butyl]-coumarin		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	kelevan (ISO) ethyl-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decachlor-4-hydroxypentacyclo(5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8})dec-4-yl)-4-oxovalerat		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	benzen-1,2,4-tricarboxylsyre-1,2-anhydrid		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	pentansyre valeniansyre		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) 2,3,6-trichlorbenzoesyre		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	benazolin (ISO) 4-chlor-2-oxobenzothiazolin-3-yleddikesyre		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	chlorfenson (ISO) 4-chlorphenyl-4-chlorbenszensulfonat		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	natrium-salt af chloreddikesyre natriumchloracetat		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etiketføring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
607-159-00-0	chlorobenzilat (ISO) ethyl-4,4'-dichlorbenzilat		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
607-176-00-3	Blanding af: α -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyl- ω -hydroxypoly(oxyethylen); α -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyl- ω -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyloxypoly(oxyethylen)	400-830-7		—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-36/37-61		
607-188-00-9	hydrogennatrium-N-carboxylatoethyl-N-octadec-9-enylmaleamat	402-970-4		—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24/37-61		
607-209-00-1	Blanding af: O,O-di(1-methylethyl)trithio-bis-thioformat; O,O-di(1-methylethyl)tetra-thio-bis-thioformat; O,O-di(1-methylethyl)pentathio-bis-thioformat	403-030-6		—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-36/37-60-61		
607-213-00-3	ethyl-3,3-bis[(1,1-dimethylpropyl)peroxy]butyrat	403-320-2		67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2)-3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-ethoxyethyl-2-(4-(2,6-dihydro-2,6-dioxo-7-phenyl-1,5-dioxindacen-3-yl)phenoxy)acetat	403-960-2		—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-24-37-61		
607-243-00-7	natrium-3,6-dichlor-o-anisat [1] 3,6-dichlor-o-anisyre, forbindelse med 2,2'-iminodiethanol (1:1) [2] 3,6-dichlor-o-anisyre, forbindelse med 2-aminoethanol (1:1) [3] dicamba-natrium [1] dicamba, forbindelse med 2,2'-iminodiethanol (1:1) [2] dicamba, forbindelse else 2-aminoethanol [3]	217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]		1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	naptalam-natrium	205-073-4		132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
607-249-00-X	(1-methyl-1,2-ethandiy)bis(oxy(methyl-2,1-ethandiy)diacrylat		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 10%: Xi; R36/37/38-43 1% ≤ C < 10%: Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-cyhalothrin (ISO)		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	fluroxypyr (ISO)		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	acrylonitril	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20%: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10% ≤ C < 20%: T; R45-23/24/25-41-43 5% ≤ C < 10%: T; R45-23/24/25-36-43 1% ≤ C < 5%: T; R45-23/24/25-43 0,2% ≤ C < 1%: T; R45-20/21/22 0,1% ≤ C < 0,2%: T; R45	
608-016-00-5	1,4-dicyano-2,3,5,6-tetra-chlor-benzen		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterb (ISO) 2-tert-butyl-4,6-dinitrophenol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofen (ISO) 2,4-dichlorphenyl-4-nitrophenylether	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	tecnazen (ISO) 1,2,4,5-tetrachlor-3-nitrobenzen		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
611-008-00-4	4-aminoazobenzen		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	trilithium-1-hydroxy-7-(3-sulfonatoamino)-2-(3-methyl-4-(2-methoxy-4-(3-sulfonatophenylazo)phenylazo)phenylazo)naphthalen-3-sulfonat		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-iminocyclohexa-2,5-dienylidenmethyl)endianilinhydrochlorid		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-methoxyanilin <i>ortho</i> -anisidin	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidin 4,4'-diaminobiphenyl	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %; T; R45-22 0,01 % ≤ C < 25 %; T; R45	
612-051-00-1	4,4'-diaminodiphenylmethan 4,4'-methylendianilin	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/ 21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	salte af 4,4'-bi- <i>o</i> -toluidin	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-methyl- <i>m</i> -phenylendiamin	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-piperazin-1-ylethylamin		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
612-111-00-7	2-methyl- <i>m</i> -phenyldiamin		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2)-24-36/37-61		
612-125-00-3	2-methyl- <i>p</i> -phenyldiamin		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2)-24-37-45-61		
612-144-00-7	flumethralin (ISO)		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2)-36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotoluen <i>o</i> -methylphenyldiamin	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	morfamquat (ISO) 1,1'-bis(3,5-dimethylmorpholinocarbonyl- methyl)-4,4'-dipyridyl		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-031-00-5	symclosen		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2)-8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-phenyl-1,3,5-triazin-2,4-diyldiamin benzguanamin 6-phenyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-042-00-5	1-[2-(allyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]- 1H-imidazol		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		
613-043-00-0	1-[2-(allyloxy)ethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)- 1H-imidazoliumhydrogensulfat [1] (±)-1-[2-(allyloxy)ethyl-2-(2,4-dichloro- phenyl)-1H-imidazoliumhydrogensulfat [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
613-066-00-6	terbumeton (ISO) 2-tert-butylamino-4-ethylamino-6-methoxy-1,3,5-triazin		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
613-091-00-2	morfamquatdichlorid [1] morfamquatsulfat [2]	225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61			
613-098-00-0	N-(n-octyl)-2-pyrrolidinon	403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-61			
613-130-00-3	hexaconazol (ISO)	—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61			
613-131-00-9	pyroquilon (ISO)	—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61			
613-134-00-5	myclobutanil (ISO)	—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2)-36/37-46-61			
613-137-00-1	methabenzthiazuron (ISO)	242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61			
613-139-00-2	metsulfuron-methyl	—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61			
614-001-00-4	nicotin (ISO)	200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61			
614-006-00-1	brucin	206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)-13-45-61			

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
614-007-00-7	brucinsulfat [1] brucimnitrat [2] strychnidin-10-on, 2,3-dimethoxy-, mono[(R)-1-methylheptyl-1,2-benzendicarboxylat] [3] strychnidin-10-on, 2,3-dimethoxy-, forbindelse med (S)-mono(1-methylheptyl)-1,2-benzendicarboxylat (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)13-45-61		
615-006-00-4	2-methyl-m-phenylendiisocyanat [1] 4-methyl-m-phenylendiisocyanat [2] m-tolyldiisocyanat [3] 2,6-diisocyanatotoluen [1] 2,4-diisocyanatotoluen [2] diisocyanatotoluen [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2)23-36/37-45-61	C ≥ 20%: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%: T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%: T; R23-40-42/43 0.1% ≤ C < 1%: Xn; R20-42	2
616-010-00-9	chloramin T, natrium salt tosylchloramidnatrium		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	pyracarbolid (ISO)		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	cymoxamil 2-cyan-N-[(ethylamino)carbonyl]-2-(methoxymino)acetamid		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)36/37-60-61		
617-004-00-9	1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylhydroperoxid		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2)3/7-14-26 -36/37/39-45-60-61	C ≥ 25%: C; R22-34 10% ≤ C < 25%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	bis(α,α-dimethylbenzyl)peroxid		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	dibenzoylperoxid		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	chlordimeform (ISO) N ² -(4-chlor-o-tolyl)-N ¹ ,N ¹ -dimethylformamidin		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2)22-36/37-60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etiketføring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
650-008-00-9	draxolon (ISO) 4-(2-chlorphenylhydrazono)-3-methyl-5-isoxazolone		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	chlordimeformhydrochlorid N'-(4-chlor-o-tolyl)-N,N-dimethylformamidmonohydrochlorid		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvalerat (ISO)		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triasulfuron (ISO)		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

BILAG 1D

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
006-090-00-8	2-(3-iodprop-2-yn-1-yloxy)ethylphenylcarbammat		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2)-22-26-39-61		
014-016-00-0	Blanding af: 1,3-dihex-5-en-1-yl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxan; 1,3-dihexen-1-yl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxan		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	calcium-P,P'-(1-hydroxyethyliden)bis(hydrogenphosphonat)dihydrat		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Blanding af: thiobis(4,1-phenylen)-S,S',S',S'-tetraphenyldisulfoniumbishafluorophosphat;diphenyl(4-phenylthiophenyl)sulfoniumhexafluorophosphat		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2)-15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bis(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenoxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-diphosphaspiro[5,5]undecan		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	3-(hydroxyphenylphosphinyl)propansyre		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
601-050-00-1	benzen, C ₁₀ H ₁₃ alkylderivat		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	but-3-en-1-ylbenzen		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2)-37-61		
602-083-00-4	diphenylether, pentabromderivat		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dichlor-1-fluorethan		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(phenylmethoxy)naphthalen		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
603-129-00-6	1-tert-butoxypropan-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2)-26-39		
603-130-00-1	Blanding af isomerer af: α -(dimethyl)biphenyl- <i>o</i> -hydroxypoly(oxyethylen)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-39-61		
603-131-00-7	Blanding (3:1) af: 1-deoxy-1-[methyl-(1-oxododecyl)amino]-D-glucitol; 1-deoxy-1-[methyl-(1-oxotetradecyl)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-132-00-2	2-hydroxymethyl-9-methyl-6-(1-methyletyl)-1,4-dioxaspiro[4,5]decan		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2)-26-37/39-61		
603-133-00-8	Blanding af: 3-[(4-amino-2-chlor-5-nitrophenyl)amino]propan-1,2-diol; 3,3'-(2-chlor-5-nitro-1,4-phenylendiimino)bis(propan-1,2-diol)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-22-36-61		
603-134-00-3	Blanding af substitueret dodecyl og/eller tetradecyl diphenylethere. Stoffet er fremstillet ved Friedel-Crafts-reaktion. Katalysatoren bliver fjernet fra reaktionsprodukter. Diphenylether bliver substitueret med C1-C10-alkylgrupper. Alkylgrupperne bliver bundet tilfældigt til kulstofatomer mellem position 1 og 6. Linear C12 og C14, 50/50 benyttes.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2',2''-nitrilotris(ethanolato)]-1-N,O]-bis[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]titan		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2)-26-39-61		
603-136-00-4	3-(4-(bis(2-hydroxyethyl)amino)-2-nitrophenyl)amino-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-24-37-61		
603-137-00-X	Blanding af: 1-desoxy-1-[methyl-(1-oxohexadecyl)amino]-D-glucitol; 1-deoxy-1-[methyl-(1-oxooctadecyl)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-138-00-5	2,2-dimethyl-3-(3-methylphenyl)propan-1-ol		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etiketføring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
604-050-00-X	4-chlor-o-cresol		216-381-3	1570-64-5	T: R23 C: R35 N: R50	T: C: N R: 23-35-50 S: (1/2-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25%: T; C; R23-35 10% ≤ C < 25%: C; R20-35 5% ≤ C < 10%: C; R20-34 3% ≤ C < 5%: Xn; R20-36/37/38 1% ≤ C < 3%: Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-bis((3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy)benzyl)-2,4,6-trimethylphenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-methylenbis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-methyl-4-(1,1-dimethylethyl)-6-(1-methylpentadecyl)-phenol		410-760-9	157661-93-3	Xi: R38 R43 N: R50-53	Xi: N R: 38-43-50/53 S: (2-24-37-60-61		
604-054-00-1	Blanding af: 2-methoxy-4-(tetrahydro-4-methylen-2H-pyran-2-yl)-phenol; 4-(3,6-dihydro-4-methyl-2H-pyran-2-yl)-2-methoxyphenol		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-((3,3',5,5'-tetramethyl-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl)bis(oxy)methyl)en))bisoxiran		413-900-7	85954-11-6	Mut. Cat. 3; R40	Xn R: 40 S: (2-22-36-37		
605-027-00-7	Blanding af: 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-methano-1H-inden-6-carboxaldehyd; 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-methano-1H-inden-5-carboxaldehyd		410-480-7	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-24-37-61		
606-051-00-0	4-pentylcyclohexanon		406-670-4	61203-83-6	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutylamino)-2-hydroxy-2'-carboxy-2-(4-dibutylamino-2-hydroxybenzoyl)benzoesyre		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluoroxypyrimetyl (ISO) [1] fluoroxypyrimetyl (ISO) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N: R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
607-273-00-0	ammonium-7-(2,6-dimethyl-8-(2,2-dimethylbutyryloxy)-1,2,6,7,8,8a-hexahydro-1-naphthyl)-3,5-dihydroxyheptanoat		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	3-amino-2-butenato di 2-(N-benzil-N-metilammino)etile		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-275-00-1	natrium-4-(benzyloxy)benszensulfonat		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-276-00-7	bis[(1-methylimidazol)-(2-ethyl-hexanoat)], zinkcomplex		405-635-0	—	Xi: R38-41 N: R50-53	Xi: N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Blanding af: 2-(hexylthio)ethylaminhydrochlorid; natriumpropionat		405-720-2	—	Xn: R22 Xi: R41 R43 N: R51-53	Xn: N R: 22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Blanding af isomerer af: natriumphenethylnaphthalensulfonat; natrium(2-naphthyl)ethylbenszensulfonat		405-760-0	—	Xi: R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Blanding af: N-octadecylaminodietylbis(hydrogermaleat); N-octadecylaminodietylhydrogenmaleathydrogenphthalat		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-280-00-9	natrium-4-chlor-1-hydroxybutan-1-sulfonat		406-190-5	54322-20-2	Xn: R22 Xi: R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2)-22-26-36/37		
607-281-00-4	Blanding af forgrenet og lineær C7-C9 alkyl-3-[3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]propionater		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-acetoxymethyl-4-benzyloxybut-1-ylacetat		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
607-283-00-5	(E)-ethyl-4-oxo-4-phenylcrotonat		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2)-26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Blanding (9:1) af: natrium 3,3'-(1,4-phenylen-bis(carbonylimino-3,1-propan-diyylimino))bis(10-amino-6,1,3-dichlor)-4,1,1-triphenodioxazin-disulfonat; lithium-3,3'-(1,4-phenylenbis(carbonylimino-3,1-propan-diyylimino))bis(10-amino-6,1,3-dichlor)-4,1,1-triphenodioxazin-disulfonat;		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Blanding af: 7-(((3-aminophenyl)sulfonyl)amino)naphthalen-1,3-disulfonsyre; natrium 7-(((3-aminophenyl)sulfonyl)amino)naphthalen-1,3-disulfonat; kalium-7-(((3-aminophenyl)sulfonyl)amino)naphthalen-1,3-disulfonat		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-286-00-1	Blanding af: natrium/kalium-7-[[[3-[[4-(2-hydroxy-naphthyl)azo]phenyl]sulfonyl]sulfonyl]amino]naphthalen-1,3-disulfonat		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-22-24-37-61		
607-287-00-7	O'-methyl-O-(1-methyl-2-methacryloyloxy-ethyl)-1,2,3,6-tetrahydrophthalat		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	tetraetatrium-(3-(1-(3-(e-6-dichlor-5-cyanopyrimidin-f-yl(methyl)amino)propyl)-1,6-dihydro-2-hydroxy-4-methyl-6-oxo-3-pyridyl)azo)-4-sulfonatophenylsulfamoylphthalocyanin-a,b,d-trisulfonat(6-))mikkel (II), hvor a er 1 eller 2 eller 3 eller 4, b er 8 eller 9 eller 10 eller 11, c er 15 eller 16 eller 17 eller 18, d er 22 eller 23 eller 24 eller 25, og hvor e og f er enten 2 og 4 eller 4 og 2		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2)-22-26-36/37-61		
607-289-00-8	3-(3-(4-(2,4-bis(1,1-dimethylpropyl)phenoxy)butylamino)carbonyl-4-hydroxy-1-naphthalenyl)thio)propansyre		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Blanding (forhold ukendt) af: ammonium-1-C14-C18-alkyloxycarbonyl-2-(3-allyloxy-2-hydroxypropoxycarbonyl)ethan-1-sulfonat; ammonium-2-C14-C18-alkyloxycarbonyl-1-(3-allyloxy-2-hydroxypropoxycarbonyl)ethan-1-sulfonat		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-291-00-9	dodecyl-ω-(C5/C6-cycloalkyl)alkylcarboxylat		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
607-292-00-4	Blanding af: [1-(methoxymethyl)-2-(C12-alkoxy)ethoxy]eddikesyre; [1-(methoxymethyl)-2-(C14-alkoxy)ethoxy]eddikesyre		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Blanding af: N-(2-aminoethyl)piperazoniummono-2,4,6-trimethylnonyldiphenylether-ar'-disulfonat; N-aminoethylpiperazoniumdi-2,4,6-trimethylnonyldiphenylethersulfonat		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2)-26-36/37/39-61		
607-294-00-5	natrium-2-benzoyloxy-1-hydroxyethane-sulfonat		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-295-00-0	Blanding af: tetranatrium-phosphonethan-1,2-dicarboxylat; hexanatrium-phosphonbutan-1,2,3,4-tetracarboxylat		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-296-00-6	Blanding af: tetraestere af pentaerythriol med heptansyre og 2-ethylhexansyre		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E,E)-3,3'-(1,4-phenylendimethyliden)bis(2-oxobornan-10-sulfonsyre)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
607-298-00-7	2-(trimethylammonium)ethoxycarboxybenzen-4-sulfonat		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-36/37		
607-299-00-2	methyl-3-(acetylthio)-2-methylpropanat		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-300-00-6	trinatrium-[2-(5-chlor-2,6-difluorpyrimidin-4-ylamino)-5-(b-sulfamoyl-c-d-sulfonatophthalocyanin-yl)-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonylamino]benzoato(5-)[cuprat(II)] hvor a = 1, 2, 3 eller 4, b = 8, 9, 10 eller 11, c = 15, 16, 17 eller 18, d = 22, 23, 24 eller 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-301-00-1	Blanding af: dodecansyre; poly(1-7)lactatestere af dodecansyre		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
607-302-00-7	Blanding af: tetradecansyre; poly(1-7)lactate- stere af tetradecansyre		411-910-6	—	Xi: R38-41 R43 N: R51-53	Xi: N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-cyclopropyl-6,7-difluor-1,4-dihydro-4-oxoqui- nolin-3-carboxylsyre		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat.3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-chlorophenyl)-2-phenyl-2-[(1H-1,2,4-triazol- 1-yl)methyl]butannitril		406-140-2	114369-43-6	N: R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butyl-N-phenethylamino)phenyl)ethen- 1,1,2-tricarbonitril		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benzyloxy)phenylacetonnitril		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hydrazin-trinitromethan		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-(2-brom-2-nitroethyl)furan		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45- 60-61		
611-043-00-5	Blanding (2:1:1) af: trimatrium-N(1')-N(2):N(1'')- N(2'')-η-6-[2-amino-4-(eller 6)-hydroxy-(eller 4-amino-2-hydroxy)phenylazo]-6''-(1-carbani- loyl-2-hydroxyprop-1-enylazo)-5',5'''-disulfa- moyl-3,3'''-disulfonatobis(naphthalen-2,1'-azo- benzen-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromat; trina- trium N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis(1-carba- niloyl-2-hydroxyprop-1-enylazo)-5',5'''-disulfa- moyl-3,3'''-disulfonatobis(naphthalen-2,1' azo- benzen-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromat; trina- trium-N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis [2-amino-4-(eller 6)-hydroxy-(eller 4-amino- 2-hydroxy)phenylazo]5',5'''-disulfamoyl-3,3''- disulfonatobis(naphthalen-2,1' azobenzen- 1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromat		402-850-1	—	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etiketføring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
611-044-00-0	Blanding af: tert-alkyl(C12-C14)ammonium bis[1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]chromat(1-); tert-alkyl(C12-C14)ammonium-bis[1-[(2-hydroxy-4-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]chromat(1-); tert-alkyl(C12-C14)ammonium-bis[1-[[5-(1,1-dimethylpropyl)-2-hydroxy-3-nitrophenyl]azo]-2-naphthalenolato(2-)]chromat(1-); tert-alkyl(C12-C14)ammonium-[[1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]-1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]chromat(1-); tert-alkyl(C12-C14)ammonium-[[1-[[5-(1,1-dimethylpropyl)-2-hydroxy-3-nitrophenyl]azo]-2-naphthalenolato(2-)]-1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]chromat(1-); C12-14-tert-alkylammonium(1-(4(eller 5)-nitro-2-oxidophenyl)azo)-2-naphthalenolato(1-(3-nitro-2-oxido-5-pentylphenyl)azo)-2-naphthalenolato(1-)		403-720-7	117527-94-3	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acetoxylbutyl)-N-ethylamino-2-methylphenylazo]-3-acetyl-5-nitrothiophen		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	3-methyl-4,4'-azodianilin		407-590-2	43151-99-1	T: R25 Xn; R48/22 R43 N: R50-53	T: N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Blanding (1:1) af: 2-[[4-[N-ethyl-N-(2-acetoxyethyl)amino]phenylazo]-5,6-dichlorbenzothiazol]; 2-[[4-[N-ethyl-N-(2-acetoxyethyl)amino]phenylazo]-6,7-dichlorbenzothiazol		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Blanding (1:1) af: 2-[[4-bis(2-acetoxyethyl)amino]phenylazo]-5,6-dichlorbenzothiazol]; 2-[[4-bis(2-acetoxyethyl)amino]phenylazo]-6,7-dichlorbenzothiazol		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
611-049-00-8	7-[4-(3-diethylaminopropylamino)-6-(3-diethylammonioethylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino]-4-hydroxy-3-(4-phenylazophenylazo)naphthalen-2-sulfonat, eddikesyre, malkesyre (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2)-(22-36/37-61)		
611-051-00-9	2-(4-(N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl)amino-2-methylphenyl)azo-6-methoxy-3-methylbenzothiazoliumchlorid		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	mononatrium-aqua-[5-[[2,4-dihydroxy-5-[(2-hydroxy-3,5-dinitrophenyl)azo]phenyl]azo]-2-naphthalensulfonat], jernkompleks		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Blanding af: trihexadecylmethylammoniumchlorid; dihexadecyldimethylammoniumchlorid		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-benzo[b]thien-2-ylethanonoximhydrochlorid		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2)-22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Blanding af: bis(5-dodecyl-2-hydroxybenzaloximat)-kobber (II). C12-alkylgruppen er forgrenet; 4-dodecylsilyldoxim		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Reaktionsprodukter af: trimethylhexamethylen-diamine (en blanding af 2,2,4-trimethyl-1,6-hexandiamin og 2,4,4-trimethyl-1,6-hexandiamin, Einecs-listet), Epoxide 8 (mono[(C10-C16-alkyloxy)methyl]oxiran-derivater) og p-toluen-sulfonsyre		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-tert-butyl-5-(4-tert-butylbenzylthio)-4-chlorpyridazin-3(2H)-on		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2)-36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(piperazin-1,4-diyl)dipropyl]bis(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[1,1-m,n][3,8]phenanthrolin-1,3,6-trione		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettering	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
613-151-00-8	1-(3-mesyloxy-5-trityloxy-2-D-threofuryl)thymin		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	phenyl-N-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbammat		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-trichlorpyridin		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-chlor-6-methoxypyrimidin		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-chlor-2,3-difluopyridin		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-butyl-4-chlor-5-formylimidazol		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5(methoxymethyl)pyrimidin		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-dichlor-5-trifluormethylpyridin		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]ethoxy]quinazolin		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-methyl-2,5-diazobicyclo[2.2.1]heptandihydrobromid		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	methyl-3-isocyanatosulfonyl-thiophen-2-carboxylat		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		

Index No	Kemisk navn	Noter vedrørende stoffer	EC No	CAS No	Klassificering	Etikettring	Koncentrationsgrænser	Noter vedrørende tilberedninger
615-023-00-7	2-(isocyanatosulfonylmethyl)benzoesyre-methylester		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2)-23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dichlor-4-ethyl-2-hydroxyphenyl)-2-(3-pentadecylphenoxy)butanamid		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-chlor-3-cyan-5-formyl-2-thienylazo)-5'-diethylamino-2-methoxyacetanilid		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-chlor-7-methylpyrazolo(1,5-b)-1,2,4-triazol-4-yl)propyl)-2-(2,4-di-tert-pentylphenoxy)octanamid		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Blanding af: 2,2',2'',2'''-(ethylendinitrietotetrakis-N,N-di(C16)alkyl)acetamid; 2,2',2'',2'''-(ethylendinitrietotetrakis-N,N-di(C18)alkyl)acetamid		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
616-048-00-6	3'-trifluormethylisobutyranilid		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2)-22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenoxy)-N-(3,5-dichlor-4-ethyl-2-hydroxyphenyl)hexanamid		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-dichlor-4-(1,1,2,3,3-hexafluorpropoxy)phenyl]aminocarbonyl]-2,6-difluorbenzamid		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
616-051-00-2	Blanding af: 2,4-bis(N'-(4-methylphenyl)ureido)toluen; 2,6-bis(N'-(4-methylphenyl)ureido)toluen		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-methylbenzoyl)peroxid		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2)-7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	cyproconazol (ISO)		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2)-36/37-60-61		

BILAG 2

R 66

IT: L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den DE version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

(Vedrører ikke den SV version)

BILAG 3A

S 23

FR: Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den DE version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

(Vedrører ikke den SV version)

S 26

DE: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

(Vedrører ikke den SV version)

S 56

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

(Vedrører ikke den SV version)

—

BILAG 3B

S 27/28

DE: Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben).

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

(Vedrører ikke den SV version)

S 29/56

ES: No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

DE: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Do not empty into drains, dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Non gettare i residui nelle fognature; smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

NL: Afval niet in de gootsteen werpen; deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

SV: Töm ej i avloppet, lämna detta material och dess behållare till insamlingsställe för farligt avfall.

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

BILAG 4A

»B.10. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I CELLER FRA PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 473 In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med in vitro-testen for kromosomaberrationer er at påvise, om et stof eller andet forårsager strukturelle kromosomafvigelser i dyrkede pattedyrceller (1) (2) (3). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. Den foreliggende metode er imidlertid ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til dette formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgsdyr.

I in vitro-testen for kromosomaberrationer kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer, cellestammer eller primære cellekulturer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning, karotypens stabilitet, kromosomtallet, kromosomdiversitet og hyppighed af spontane kromosomaberrationer.

Ved udførelse af in vitro-test er det i reglen nødvendigt at benytte en exogen kilde til metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændig efterligne betingelserne i et levende pattedyr. Man må omhyggeligt undgå betingelser, som fører til et positivt resultat, der ikke skyldes selve mutageniciteten, men kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoxicitet (4) (5).

Testen benyttes til at screene for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der giver positivt resultat med denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, men der er ikke fuldstændig korrelation mellem testen og carcinogenicitet. Korrelationen afhænger af den kemiske sammensætning, og der er stadig tydeligere tegn på, at nogle carcinogener ikke påvises ved denne test, fordi de lader til at virke ved andre mekanismer end direkte beskadigelse af dna.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Endofordobling: en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i dna-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor forskydning af kromatiderne er minimal.

Mitoseindeks: forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; det viser populationens formeringsgrad.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtallet (n), som ikke er det diploide tal (dvs. $3n$, $4n$ osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Cellekulturer udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Efter forud fastsatte tidsrum efter at være udsat for teststoffet behandles kulturerne med et metafasestandsendende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin), hvorefter de høstes og farves; dernæst undersøges metafasecellerne mikroskopisk for forekomst af kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. Præparater

1.4.1.1. Celler

Der kan benyttes en række forskellige cellelinjer, -stammer og primære cellekulturer, herunder humane celler (f.eks. fibroblaster fra kinesisk hamster eller perifere blodlymfocytter fra det perifere blod hos mennesker eller andre pattedyr).

1.4.1.2. Substrater og dyrkningsforhold

Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningssubstrater og inkuberingsbetingelser (dyrkningsflasker, CO_2 -koncentration, temperatur og luftfugtighed). Etablerede cellelinjer og -stammer kontrolleres regelmæssigt for stabilt karakteristisk kromosomtallet og mycoplasmakontaminering; i tilfælde af kontaminering anvendes kulturen ikke. Cellernes normale cyklusstid og dyrkningsbetingelserne skal være kendt.

1.4.1.3. Fremstilling af kulturer

Etablerede cellelinjer og -stammer: celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningssubstrat med en sådan tæthed, at kulturerne ikke flyder sammen inden høst, og inkuberes ved $37^\circ C$.

Lymfocytter: fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller lymfocytter fra sunde individer tilsættes til dyrkningssubstratet, der indeholder et mitogen (f.eks. phytohemagglutinin), og inkuberes ved $37^\circ C$.

1.4.1.4. Metabolismeaktivering

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af lever fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9), eller en blanding af phenobarbiton og β -naphthoflavon (10) (11) (12).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10% (v/v) i det færdige testsubstrat. Et metabolismeaktiveringssystemets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5. Teststof/testpræparat

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. Opløsningsmiddel/bærestof

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes med tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2. Eksponeringskoncentrationer

Stoffets cytotoxicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoxiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. konfluens, antal levedygtige celler eller mitoseindeks. Der kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoxicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst 3 analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytotoxicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højest er adskilt med en faktor mellem 2 og $\sqrt{10}$. På højsttidspunktet skal konfluens, celleantal eller mitoseindeks være faldet signifikant ved den højeste koncentration (mere end 50%). Mitoseindekset er kun et direkte mål for cytotoxisk/cytostatisk virkning og afhænger af, hvor lang tid der er forløbet efter behandlingen. Mitoseindeks er dog acceptabel for dyrkning i rystekolber, hvor andre toksicitetsmål er besværlige eller ubrugelige i praksis. Oplysninger om celleyklens kinetik, såsom den gennemsnitlige generationstid (AGT), kan benyttes som supplerende information. AGT er imidlertid et overordnet gennemsnit, der ikke altid afslører forsinkede subpopulationer, og selv en lille forøgelse af den gennemsnitlige generationstid kan føre til en meget betydelig forsinkelse af tidspunktet for optimalt udbytte af aberrationer.

For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoxiske, må testkoncentrationen højst være 5 µl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

For forholdsvis uopløselige stoffer, der ikke er toksiske ved koncentrationer under opløselighedsgrænsen, skal der som højeste dosis benyttes en koncentration, der er højere end opløselighedsgrænsen i det samlede dyrkningssubstrat ved behandlingens afslutning. I nogle tilfælde (f.eks. når toksicitet kun optræder over den laveste koncentration med uopløselighed) tilrådes det at gennemføre testen ved mere end én koncentration med synlig udfældning. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler S9, serum mv. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3. Negative og positive kontrolprøver

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

I positive kontrolprøver benyttes der et kendt clastogen i en mængde, der forventes at give reproducerbar og påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne, hvorved testsystemets følsomhed godtgøres.

Der vælges sådanne koncentrationer i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Metabolismeaktivering	Stof	CAS nr.	Einacs nr.
Ingen exogen metabolismeaktivering	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinoline-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Exogen metabolismeaktivering	Benzo[a]pyrene	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
	Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal i hver høst indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærestof, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3. Fremgangsmåde

1.4.3.1. *Behandling med teststof*

Celler under formering behandles med teststoffet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiverings-system. Behandling af lymfocytter påbegyndes ca. 2 døgn efter stimulering med mitogen.

- 1.4.3.2. Der benyttes normalt dobbeltbestemmelse ved hver koncentration, hvilket også stærkt tilrådes for negative kontrolprøver (kontrolprøver med opløsningsmiddel). Hvis det på grundlag af tidligere forsøg kan godtgøres, at forskellen mellem dobbeltbestemmelser (13) (14) er minimal, kan enkeltbestemmelse ved hver koncentration accepteres.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (15) (16).

1.4.3.3. *Høst af kulturer*

I det første forsøg udsættes cellerne for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange celleykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (12). Fører denne protokol til negativt resultat både med og uden aktivering, udføres endnu et forsøg, denne gang med kontinuerlig behandling indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange en normal celleyklus. Nogle kemiske stoffer er det lettere at bestemme ved behandlings-/prøveudtagningstider på mere end 1,5 gange celleyklusen. Negativt resultat med metabolismeaktivering skal bekræftes i hvert enkelt tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes.

1.4.3.4. Kromosompræparering

Cellekulturene behandles med Colcemid® eller colchicin normalt 1-3 timer før høst. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur. Kromosompræpareringen består i hypotonisk behandling af cellerne, fiksering og farvning.

1.4.3.5. Analyse

Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet ± 2 for alle celletyper. Der skal bedømmes mindst 200 vel fordelte metafaser pr. koncentration og kontrolgruppe, ligeligt fordelt mellem eventuelle dobbeltprøver. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages høje aberrationstal.

Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere polyploidi og endofordobling, hvis dette konstateres.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Da cellen er forsøgets måleenhed, bedømmes det, hvilken procentdel af cellerne der har ændret kromosomstruktur. Forskellige strukturændringer noteres med antal og hyppighed for både forsøgs- og kontrolkulturer. Gaps noteres særskilt og registreres, men medregnes normalt ikke i den samlede aberrationshyppighed.

Sideløbende målinger af cytotoxicitet for alle behandlede og negative kontrolkulturer i hovedforsøget registreres ligeledes.

Dataene præsenteres for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Der er redegjort for behovet for bekræftelse af negative resultater i punkt 1.4.3.3. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktivering.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for opnåelse af et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse eller en reproducerbar forøgelse af antallet af celler med kromosomaberrationer. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (3) (13). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

En forøgelse i antallet af polyploide celler kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkaldte kromosomantalsafvigelse. En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere celleyklusens forløb (17) (18).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagen i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Celler:

- celltype og -kilde
- den valgte celletypes karyotypiske karakteristika og egnethed
- eventuelt fravær af mycoplasma
- oplysninger om cellecyklussens længde
- bloddonorers køn, fuldblod eller fraseparerede lymfocytter samt benyttet mitogen
- eventuelt antal passager
- eventuelle metoder til vedligehold af cellekulturer
- normalt kromsotal

Testbetingelser:

- det metafasestandsede stofs betegnelse og koncentration og længden af cellernes udsættelse for stoffet
- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoxicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- substratsammensætning og eventuel CO₂-koncentration
- teststoffets koncentration
- volumen af tilsat bærestof og teststof
- inkuberingstemperatur
- inkuberingstid
- behandlingens varighed
- celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier
- positive og negative kontrolprøver
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for bedømmelse af aberrationer

- antal analyserede metafaser
- metoder til måling af toksicitet
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

- tegn på toksicitet, f.eks. konfluens, cellecyklusdata, celletælling og mitoseindeks
- tegn på udfældning
- data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt
- definitioner af aberrationer, herunder gaps
- antal celler med kromosomaberrationer og typen af disse, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur
- eventuel iagttaget ændring i ploidigrad
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelse

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427-432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpou, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

- (8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
 - (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
 - (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
 - (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
 - (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
 - (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
 - (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
 - (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooley, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
 - (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
 - (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
 - (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.
-

BILAG 4B

»B.11. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 475 »Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

In vitro-testen for kromosomaberrationer hos pattedyr benyttes til at påvise, om et teststof forårsager strukturelle kromosomafvigelse i knoglemarvceller hos dyr, normalt gnavere (1) (2) (3) (4). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelse. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromosomtypen, men også ændringer af kromatidtypen forekommer. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgssystemer.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Knoglemarv er målvævet i denne test, da det er et væv med høj vaskularisation og består af celler med kort cyklustid, som er lette at isolere og behandle. Metoden omfatter ikke andre arter og væv.

Denne test for kromosomaberrationer er særlig relevant for en vurdering af risikoen for mutationsfremkaldelse, da den giver mulighed for at tage sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser i betragtning, selv om de kan variere fra art til art og fra væv til væv. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Endofordobling: en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Antalsafvigelse: ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtallet (n), som ikke er det diploide tal (dvs. $3n$, $4n$ osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af knoglemarvceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. Præparater

1.4.1.1. Valg af dyreart

Der benyttes sædvanligvis rotter, mus og kinesiske hamstere, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. Miljø og fordring

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3. Forberedelse af dyrene

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage.

1.4.1.4. Fremstilling af doser

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmnes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. Kontrolgrupper

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser

dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontrolgrupper, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof, og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontrolldata har vist en acceptabel variation mellem dyr og hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontrolldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. Dyrenes antal og køn

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr af hvert køn. Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. Behandlingsplan

Teststofferne indgives fortrinsvis i en enkelt dosis. De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

Der udtages prøver på to tidspunkter efter endagsbehandling. For gnavere udtages første prøve normalt 1,5 normal celleykluslængde (som normalt er 12-18 timer) efter behandlingen. Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af teststoffet, og af teststoffets indvirkning på celleyklussens kinetik, anbefales det at udtage endnu en prøve 24 timer efter den første. Indgives stoffet over mere end én dag, udtages der blot én prøve, når der er gået 1,5 normal celleykluslængde efter den sidste behandling.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøve af forsøgsdyrene efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. tre-fem timer, for kinesisk hamster ca. fire-fem timer. Cellerne høstes fra knoglemarven og analyseres for kromosomaberrationer.

1.5.3. Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (5). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. mitoseindeks nedsat med mere end 50%).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af kromosomer

Umiddelbart efter aflivningen udtages knoglemarven, som udsættes for hypotonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7. Analyse

Mitoseindekset bestemmes som udtryk for cytotoxiciteten i mindst 1 000 celler pr. dyr for alle behandlede dyr (inkl. positive kontroldyr) og ubehandlede (negative) kontroldyr.

For hvert dyr bør mindst 100 celler analyseres. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet $2n \pm 2$.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte celler, antallet af aberrationer pr. celle og den procentdel af cellerne, der har kromosomaberrationer. Forskellige typer strukturelle kromosomændringer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkelt dosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (6). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

En forøgelse af ploiditetsgraden kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at fremkalde kromosomantalsafvigelser. En forøget endofordobling kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere celleyklusens forløb (7) (8).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme
- antal dyr samt deres alder og køn
- oprindelse, miljø, føde mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for indgiftsvej
- eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet
- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til måling af toksicitet
- det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for bedømmelse af aberrationer
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

- tegn på toksicitet
- mitoseindex
- antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr
- samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse
- antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse
- eventuel iagttaget ændring i ploiditetsgrad
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative kontrolprøver
- data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- data for sideløbende positive kontrolprøver

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **REFERENSER**

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, pp. 157-165.

- (3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston, R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
 - (5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
 - (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.* 119, pp. 403-413.
 - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363-1364.«
-

BILAG 4C

»B.12. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 474 »Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

In vivo-testen for mikrokerner hos pattedyr benyttes til påvisning af skader, som teststoffet har forvoldt på kromosomer eller mitoseapparatet i erythroblaster, ved analyse af erythrocytter i prøver fra knoglemarv og/eller det perifere blod hos dyr, sædvanligvis gnavere.

Formålet med mikrokernetesten er at påvise stoffer, der forvolder cytogenetiske skader, som medfører dannelse af mikrokerner indeholdende tiloversblevne kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Når en erythroblast i knoglemarven udvikler sig til en polykromatisk erythrocyt, udstødes cellekernen, og en eventuel dannet mikrokjerne kan blive tilbage i det ellers kernefrie cytoplasma. I disse celler er mikrokerner let synlige, da de ellers ikke har nogen kerne. Forøget forekomst af polykromatiske erythrocytter med mikrokjerne hos behandlede dyr er tegn på inducerede kromosomskader.

I denne test benyttes der rutinemæssigt knoglemarv hos gnavere, da der i dette væv produceres polykromatiske erythrocytter. Måling af umodne (polykromatiske) erythrocytter med mikrokjerne i det perifere blod kan også accepteres i andre arter, hvor det er vist, at milten ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokjerne, eller at deres følsomhed over for stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer, er tilstrækkelig. Mikrokerner kan genkendes på en række kriterier, bl.a. om der er en DNA-centromer til stede. Det vigtigste endpoint er hyppigheden af umodne (polykromatiske) erythrocytter med mikrokjerne. Det antal modne (normokromatiske) erythrocytter i det perifere blod, som indeholder mikrokerner, ud af et givet antal modne erythrocytter kan også benyttes som endpoint for testen, når dyrene behandles kontinuerligt i mindst fire uger.

Denne in vivo-test for mikrokerner hos pattedyr er særlig relevant for vurdering af den reelle mutagenitetsfare, idet den tager højde for sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser, selv om disse kan variere fra art til art, væv til væv og genetisk endpoint til genetisk endpoint. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Centromer: region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Mikrokerner: små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens telofase (meiose) ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Normochromatisk erythrocyt: moden erythrocyt, der mangler ribosomer og kan skelnes fra umodne polykromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

Polychromatisk erythrocyt: umoden erythrocyt på et udviklingsmellemstadium, som stadig indeholder ribosomer og derfor kan skelnes fra modne normokromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde. Hvis der benyttes knoglemarv, aflives dyrene på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter knoglemarven udtages, og der fremstilles præparater og farves (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Hvis der benyttes perifert blod, tages der blodprøver på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter der fremstilles udstrygningspræparater og farves (4) (8) (9) (10). I undersøgelser med perifert blod bør der gå så kort tid som muligt mellem sidste eksponering og cellehøst. Præparaterne analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. Præparater

1.4.1.1. Valg af dyreart

Der anbefales mus eller rotter, hvis der bruges knoglemarv, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Bruges der perifert blod, anbefales mus. Dog kan enhver egnet pattedyrart benyttes, hvis dens milt ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerner, eller hvis den er vist at være tilstrækkelig følsom til at påvise stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. Miljø og fodring

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3. Forberedelse af dyrene

Der udvælges tilfældigt unge sunde voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning.

1.4.1.4. Fremstilling af doser

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmnes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. Kontrolgrupper

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe mikrokerner in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-ethyl-N-nitrosoarea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontrol dyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med mikrokerner. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

Hvis der benyttes perifert blod, kan en forbehandlingsprøve også accepteres som sideløbende negativ kontrolprøve, men kun i de korte undersøgelser (f.eks. 1-3 behandlinger), når de opnåede resultater ligger inden for det forventede interval for den forudgående kontrolprøve.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. Dyrenes antal og køn

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr af hvert køn (11). Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkelig. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. Behandlingsplan

Der kan ikke anbefales nogen standardbehandlingsplan (dvs. 1, 2 eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum). Prøver fra længdervarende indgiftsplaner er acceptable, når blot der i undersøgelsen er påvist en positiv virkning eller — for en negativ undersøgelse — der er påvist toksicitet, eller grænsedosis har været anvendt, og når indgiften er fortsat indtil prøveudtagningen. Prøvestoffet kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materiale volumen.

Testen kan udføres på følgende to måder:

- Dyrene behandles med teststoffet én gang. Der udtages prøver af knoglemarv mindst to gange, første gang tidligst 24 timer efter behandlingen, med passende intervaller mellem prøverne, sidste prøve dog senest 48 timer efter behandlingen. Prøveudtagning tidligere end 24 timer efter behandlingen skal

begrundes. Der udtages prøver af perifert blod mindst to gange, tidligst 36 timer efter behandlingen og med passende intervaller efter den første prøve, sidste prøve dog senest efter 72 timer. Når der i en prøve er konstateret positiv reaktion, er yderligere prøveudtagning ikke nødvendigt.

- b) Benyttes der to eller flere daglige behandlinger (f.eks. to eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum) udtages der for knoglemarvs vedkommende prøver én gang mellem 18 og 24 timer efter den sidste behandling, og for perifert blods vedkommende én gang mellem 36 og 48 timer efter den sidste behandling (12).

Derudover kan der udtages prøver på andre tidspunkter, hvis det er relevant.

1.5.3. Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (13). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. en nedsættelse af andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter i knoglemarv eller perifert blod).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg p. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmessigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af knoglemarv/blod

Knoglemarvceller udtages normalt fra lårben eller skinneben umiddelbart efter aflivningen. Sædvanligvis udtages cellerne fra lårben eller skinneben, hvorefter de præpareres og farves med velkendte metoder. Perifert blod udtages fra halevenen eller et andet egnet blodkar. Blodlegemerne farves straks supravitalt (8) (9) (10), eller der fremstilles udstrygningspræparater, der derefter farves. Ved at bruge en DNA-specifik farvning (f.eks. acridinorange eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) kan man undgå nogle af de artefakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Denne fordel udelukker ikke, at der benyttes konventionelle farvestoffer (f.eks. Giemsa). Supplerende systemer (f.eks. cellulosekolonner til fjernelse af kerneindeholdende celler (16)) kan også benyttes, forudsat at de er påvist at fungere tilfredsstillende ved præparering af mikrokerner i laboratoriet.

1.5.7. Analyse

For hvert dyr bestemmes andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal (umodne og modne) erythrocytter, idet der tælles mindst 200 erythrocytter i alt for knoglemarv og 1 000 erythrocytter for perifert blod (17). Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskope-

ringen. For hvert dyr bedømmes mindst 2 000 umodne erythrocytter for forekomst af umodne erythrocytter med risikokerner. Der kan opnås yderligere information ved bedømmelse af modne erythrocytter for indhold af mikrokerner. Ved analyse af objektglas må andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter ikke være mindre end 20 % af kontrolværdien. Når dyrene behandles kontinuerligt i fire uger eller derover, kan også mindst 2 000 modne erythrocytter pr. dyr bedømmes for forekomst af mikrokerner. Systemer til automatisk analyse (billedanalyse og flow-cytometri af celleopslemninger) er acceptable som alternativer til manuel evaluering, hvis de er behørigt begrundet og valideret.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte umodne erythrocytter, antallet af umodne erythrocytter med mikrokerner og antallet af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter. Hvis dyrene behandles kontinuerligt i mere end fire uger, anføres også dataene for modne erythrocytter, hvis de foreligger. Andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter oplyses for hvert dyr, og, hvis det skønnes hensigtsmæssigt, procentdelen af erythrocytter med mikrokerner. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner hos en enkelt-dosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (18) (19). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af mikrokernetesten viser, at teststoffet fremkalder mikrokerner, som følge af beskadigelse af kromosomer eller mitoseapparat hos erythroblaster i den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder mikrokerner hos umodne erythrocytter i den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til mål vævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme
- antal dyr samt deres alder og køn
- oprindelse, miljø, føde mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet
- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for indgiftsvej
- eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet
- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til præparering af objektglas
- metoder til måling af toksicitet
- kriterier for bedømmelse af umodne erythrocytter med mikrokerner
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

- tegn på toksicitet
- andel af umodne erythrocytter i forhold til total erythrocytter
- antal umodne erythrocytter med mikrokerner, anført særskilt for hvert dyr
- gennemsnit \pm standardafvigelse for umodne erythrocytter med mikrokerner for hver gruppe
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- anvendte statistiske analyser og metoder
- data for sideløbende og tidligere negative kontrolprøver
- data for sideløbende positive kontrolprøver

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENSER

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to nonchromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

BILAG 4D

»B.13/14. MUTAGENICITET — TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 471 »Bacterial Reverse Mutation Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der aminosyrekrævede stammer af *Salmonella typhimurium* og *Escherichia coli* til at påvise punktmutationer med substitution, addition eller deletion af et eller nogle få DNA-basepar (1) (2) (3). Princippet i denne tilbagemutationstest med bakterier er, at den påviser mutationer, som tilbagemuterer mutationer i teststammerne og dermed sætter bakterien i stand til at syntetisere en essentiel aminosyre. Revertantbakterierne påvises ved deres evne til at vokse uden den aminosyre, som den oprindelige teststamme kræver.

Punktmutationer er årsagen til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og der er meget, der tyder på, at punktmutationer i onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler spiller en rolle for dannelse af tumorer hos mennesker og i forsøgsdyr. Tilbagemutationstesten med bakterier er hurtig, billig og forholdsvis let at udføre. Mange teststammer har forskellige egenskaber, der gør dem mere følsomme til påvisning af mutationer, bl.a. responsive DNA-sekvenser på reversionsstedet, høj cellepermeabilitet for store molekyler og manglende DNA-reparationssystemer eller forstærkede fejlbehæftede DNA-reparationsprocesser. Teststammernes specificitet kan give nyttige oplysninger om, hvilke typer mutationer et gentoksisk stof inducerer. Der findes en meget stor database med resultater for en lang række strukturer med tilbagemutationstest med bakterier, og der er udviklet veletablerede metodologier for test af kemikalier med forskellige fysiske og kemiske egenskaber, herunder flygtige forbindelser.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

En **tilbagemutationstest** med enten *Salmonella typhimurium* eller *Escherichia coli* påviser mutation i en aminosyrekrævende stamme (histidin eller tryptophan) til en stamme, der er uafhængig af tilførsel af aminosyren udefra.

Mutagener for baseparsubstitution er stoffer, der forårsager en baseændring i DNA'et. I en tilbagemutationstest kan denne ændring ske samme sted som den oprindelige mutation eller et andet sted i bakteriens genom.

Læserammemutagener er stoffer, der medfører insertion eller deletion af et eller flere basepar i DNA'et, således at RNA'ets læseramme ændres.

1.3. INDLEDENDE OVERVEJELSER

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der prokaryotiske celler, som adskiller sig fra pattedyrceller med hensyn til f.eks. optagelse, metabolisme, kromosomstruktur og DNA-reparationsprocesser. In vitro-test kræver normalt en exogen kilde til metabolismeaktivering. In vitro-metabolismeaktiveringssystemer kan ikke fuldstændig efterligne in vivo-forholdene i pattedyr. Testen vil derfor ikke give direkte oplysninger om et stofs mutagene og carcinogene potentiale i pattedyr.

Tilbagemutationstesten med bakterier anvendes generelt til en indledende screening for gentoksiske virkninger og, især, punktmutationsinducerende aktivitet. Det er ved hjælp af en omfattende database påvist, at mange kemiske stoffer, som giver positivt resultat i denne test, også har mutagen virkning i andre test. Der findes mutagene stoffer, der ikke er påvist ved denne test; årsagen hertil kan tilskrives det påviste endpoints speci-

fikke karakter, forskelle i metabolismeaktivering og forskelle i biotilgængelighed. På den anden side kan faktorer, der øger tilbagemutationstestens følsomhed, føre til et for højt skøn over stoffets mutagene aktivitet.

Tilbagemutationstesten med bakterier kan være uegnet til evaluering af bestemte klasser af kemiske stoffer, f.eks. stærkt baktericide forbindelser (f.eks. visse antibiotika) og forbindelser, der antages (eller vides) at gribe specifikt ind i pattedyrcellers replikationssystem (f.eks. visse topoisomeraseinhibitorer og visse nucleosidanaloger). I sådanne tilfælde kan mutationstest i pattedyr være mere velegnede.

Selv om mange af de stoffer, der er positive i denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, er korrelationen ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de virker via andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Opslæmninger af bakterieceller udsættes for teststoffet med og uden et exogent metabolismeaktiveringssystem. Ved pladeinkorporeringsmetoden blandes disse opslæmninger med en topagar og hældes ud på et minimalsubstrat. Ved præinkubationsmetoden inkuberes behandlingsblandingen, hvorefter den blandes med topagar inden udhældning på minimalsubstrat. For begge metoders vedkommende tælles revertantkolonierne efter 2-3 dages inkubation, og der sammenlignes med antallet af spontane revertantkolonier på kontrolpladerne med opløsningsmiddel.

Der er beskrevet en række fremgangsmåder for udførelse af tilbagemutationstesten med bakterier. Blandt de mest almindeligt benyttede er pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuationsmetoden (9) (10) og suspensionsmetoden (11). Der er beskrevet modifikationer til test af gasser og dampe (12).

De i denne metode beskrevne fremgangsmåder vedrører især pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. De er begge acceptable til udførelse af forsøgene både med og uden metabolismeaktivering. Nogle stoffer, bl.a. kortkædede alifatiske nitrosaminer, divalente metaller, aldehyder, azofarvestoffer og diazoforbindelser, pyrollizidinalkaloider, allylforbindelser og nitroforbindelser (3), kan mest effektivt påvises ved præinkubationsmetoden. Det er også kendt, at visse klasser af mutagener ikke altid påvises ved standardmetoder som f.eks. pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. Sådanne tilfælde bør betragtes som »sært tilfælde«, og det anbefales kraftigt at anvende alternative metoder til påvisning i disse tilfælde. Følgende »sært tilfælde« er konstateret (samt eksempler på fremgangsmåder, der kan benyttes til påvisning): azofarvestoffer og diazoforbindelser (3) (5) (6) (13), gasser og flygtige stoffer (12) (14) (15) (16) og glycosider (17) (18). Afvigelser fra standardmetoden skal begrundes sagligt.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. Præparater

1.5.1.1. Bakterier

Friske bakteriekulturer fremdyrkes til den sidste del af den eksponentielle fase eller til begyndelsen af den stationære fase (ca. 10^9 celler pr. ml). Kulturer sidst i den stationære fase bør ikke benyttes. Det er vigtigt, at de kulturer, der benyttes i forsøgene, har et højt indhold af levedygtige bakterier. Titeren kan godtgøres enten ved hjælp af tidligere kontrolldata for vækstkurver eller ved bestemmelse af antallet af levedygtige celler i det enkelte forsøg ved udpladning.

Som inkubationstemperatur anbefales 37 °C.

Der skal benyttes mindst fem bakteriestammer, deriblandt fire stammer af *S. typhimurium* (TA1535, TA98, TA100 samt TA1537, TA97a eller TA97), som er påvist at være pålidelige, og hvis respons er reproducerbar mellem laboratorier. Disse fire *S. typhimurium*-stammer har GC-basepar på de primære reversionssted, og det vides, at de ikke altid påviser visse oxiderende mutagener, tværbindingende stoffer og hydraziner. Sådanne stoffer kan påvises med *E. coli* WP2-stammer eller *S. typhimurium* TA102 (19), som har AT-basepar på det primære reversionssted. Derfor kan følgende kombination af stammer anbefales:

- *S. typhimurium* TA 1535
- *S. typhimurium* TA 1537, TA97 eller TA97a
- *S. typhimurium* TA98
- *S. typhimurium* TA100
- *E. coli* WP2 *uvrA*, *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101) eller *S. typhimurium* TA102.

For at kunne påvise tværbindinge mutagener kan det foretrækkes at vælge TA102 eller at tilføje en DNA-reparationsdygtig stamme af *E. coli* (f.eks. *E. coli* WP2 eller *E. coli* WP2 (pKM101)).

Der benyttes anerkendte metoder til stamkulturfremstilling, markørverifikation og opbevaring. For hver enkelt frosset kulturpræparat påvises den aminosyrebetingsede vækst (histidin for *S. typhimurium*-stammer og tryptophan for *E. coli*-stammer). Andre fænotypiske egenskaber skal kontrolleres på lignende måde, således tilstedeværende eller manglende R-faktorplasmider, når det er relevant (dvs. ampicillinresistens hos TA98-stammen, TA-100- og TA97a- eller TA97-stammen, WP2 *uvrA*-stammen og WP2 *uvrA* (pKM101)-stammen, samt ampicillin- og tetracyclinresistens hos TA102-stammen), tilstedeværelse af karakteristiske mutationer (dvs. *rfa*-mutation hos *S. typhimurium* ved hjælp af følsomhed over for krystalviolet og *uvrA*-mutation hos *E. coli* eller *uvrB*-mutation hos *S. typhimurium* ved hjælp af følsomhed over for ultraviolet lys) (2) (3). Stammerne skal ligeledes give kintal for spontane revertanter inden for den hyppighed, der må forventes ud fra laboratoriets hidtidige kontrolldata, og helst inden for den hyppighed, der er angivet i litteraturen.

1.5.1.2. *Substrat*

Der benyttes en egnet minimalager (f.eks. med Vogel-Bonner minimalsubstrat E og glucose) og en topagar med histidin og biotin eller tryptophan, så der tillades nogle få celledelinger (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolismeaktivering*

Bakterierne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af leveren fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerede stoffer såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en blanding af phenobarbiton og β -naphthoflavon (18) (20) (21). Postmitokondriefractionen anvendes normalt i en koncentration på 5-30% (v/v) i S9-blandingen. Valg af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration. For azofarvestoffer og diazoforbindelser kan et reduktivt metabolismeaktiveringssystem være mere velegnet (6) (13).

1.5.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af bakterierne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof skal være kompatibel med bakteriernes overlevelse og S9-aktiviteten (22). Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie.

1.5.2. **Testbetingelser**

1.5.2.1. *Teststammer* (se punkt 1.5.1.1)

1.5.2.2. *Eksponeringskoncentration*

Stoffets cytotoxicitet og dets opløselighed i den endelige testblanding er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme toksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg. Cytotoksicitet kan påvises ved et fald i antallet af revertantkolonier, ved en opklaring eller hæmning af baggrundsvæksten eller ved graden af overlevelse i de behandlede kulturer. Et stofs cytotoksicitet kan ændres ved, at der er metabolismeaktiveringssystemer til stede. Uopløselighed bedømmes ved, at der med det blotte øje kan iagttages udfældning i slutblandingen under de faktiske forsøgsbetingelser.

Der anbefales en maksimal testkoncentration af opløselige ikke-cytotoksiske stoffer på 5 mg/plade eller 5 µl/plade. For ikke-cytotoksiske stoffer, der ikke er opløselige med 5 mg/plade eller 5 µl/plade, skal en eller flere af de undersøgte koncentrationer være uopløselig i slutblandingen. Teststoffer, der er cytotoksiske allerede under 5 mg/plade eller 5 µl/plade, testes op til den cytotoksiske koncentration. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

Der benyttes mindst fem forskellige analyserbare koncentrationer af teststoffer med en afstand på ca. en halv logaritme ($\sqrt{10}$) mellem koncentrationerne i det indledende forsøg. Ved undersøgelse af en koncentration/respons-sammenhæng kan mindre intervaller være hensigtsmæssigt. Test ved koncentrationer over 5 mg/plade eller 5 µl/plade kan tages under overvejelse, når bedømmelsen vedrører stoffer med et betydeligt indhold af potentielt mutagene urenheder.

1.5.2.3. Negative og positive kontrolprøver

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) stamme-specifikke kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Der vælges en sådan koncentration i den positive kontrol, at det enkelte forsøg effektivitet godtgøres.

Ved forsøg med metabolismeaktivering udvælges positive kontrolreferencestoffer ud fra den valgte type bakteriestamme.

Nedenfor er der eksempler på stoffer, som er egnede som positive kontrolstoffer i forsøg med metabolismeaktivering:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
9,10-dimethylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]anthracen	57-97-6	200-359-5
benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-aminoanthracen	613-13-8	210-330-9
cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	

Følgende stof er egnet som positivt kontrolstof ved reduktiv metabolismeaktivering:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Congo-rødt	573-58-0	209-358-4

2-aminoanthracen bør ikke anvendes som eneste indikator for, om S9-blandingen er effektiv. Hvis der benyttes 2-aminoanthracen, skal hver batch af S9 tillige karakteriseres med et mutagen, der kræver metabolismeaktivering med mikrosomenzymer, f.eks. benzo[a]pyren eller dimethylbenzanthracen.

Nedenfor er der eksempler på stoffer til brug som stammespecifikke positive kontrolstoffer i forsøg uden exogen metabolismeaktivering:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.	Stamme
natriumazid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 og TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 og TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 og TA 97a
cumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA og TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
4-nitroquinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
furylfuramid (AF2)	3688-53-7		plasmidholdige stammer

Der kan benyttes andre egnede referencestoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, der kun består af opløsningsmiddel eller bærestof uden teststof, og som behandles på samme måde som de øvrige testgrupper. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5.3. Fremgangsmåde

Ved pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4) uden metabolismeaktivering blandes normalt 0,05 ml eller 0,1 ml testopløsning, 0,1 ml frisk bakteriekultur (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og 0,5 ml steril buffer med 2,0 ml topagar. Ved forsøg med metabolismeaktivering blandes normalt ca. 0,5 ml metabolismeaktiveringsblanding, indeholdende en passende mængde postmitokondriefraktion (5-30% (v/v) i metabolismeaktiveringsblandingen), med topagaren (2,0 ml), bakterierne og teststoffet/testopløsningen. Indholdet i de enkelte glas blandes og hældes ud over overfladen på en minimalagarplade. Topagaren henstilles til størkning inden inkubering.

Ved præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) forinkuberes teststof/testopløsning sammen med teststammen (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og steril buffer eller metabolismeaktiveringssystemet (0,5 ml) normalt i 20 minutter ved 30-37°C, inden der blandes med topagaren, og blandingen hældes ud på overfladen af en minimalagarplade. Normalt blandes 0,05 ml eller 0,1 ml teststof/testopløsning, 0,1 ml bakteriekultur og 0,5 ml S9-blanding eller steril buffer med 2,0 ml topagar. Glassene bør under forinkuberingen beluftes i rysteapparat.

Til forsvarlig bestemmelse af variationen udføres der tredobbelt udpladning ved hvert dosisniveau. Dobbelt udpladning kan accepteres, hvis den begrundes sagligt. Tab af en plade af og til gør ikke nødvendigvis testen ubrugelig.

Gasformige og flyttige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Inkubering

Alle plader i hvert forsøg inkuberes ved 37°C i 48-72 timer. Efter inkuberingen tælles antallet af revertantkolonier pr. plade.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene forelægges som antallet af revertantkolonier pr. plade. Også antallet af revertantkolonier på både negative (opløsningsmiddelkontrol og en eventuel ubehandlet kontrol) og positive kontrolplader oplyses. Tallene for hver enkelt plade, gennemsnittet af revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen opgives for teststoffet og for positive og negative kontrolplader (ubehandlede og/eller med opløsningsmiddel).

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning, behandlingsmetoden (pladeinkorporering eller væske-præinkubation) og metabolismeaktivering.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade i det undersøgte interval og/eller en reproducerbar forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade ved en eller flere koncentrationer, for mindst én stamme med eller uden metabolismeaktivering (23). Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (24). Statistisk signifikans bør dog ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en tilbagemutationstest med bakterier viser, at teststoffet fremkalder punktmutationer ved basesubstitution eller læserammeforskydning i genomet hos *Salmonella typhimurium* og/eller *Escherichia coli*. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke er mutagent i den undersøgte organisme.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Stammer:

- anvendte stammer
- antal celler pr. kultur
- karakteristika for stammen

Testbetingelser:

- mængde teststof pr. plade (mg/plade eller µl/plade) med begrundelse for valg af dosis og pladeantal pr. koncentration
- anvendte substrater
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier
- behandlingsmetoder

Resultater:

- tegn på toksicitet
- tegn på udfældning
- kimal for de enkelte plader
- gennemsnitligt antal revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelse
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelse

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENSER

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.
 - (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
 - (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
 - (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
 - (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
 - (14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
 - (15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
 - (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
 - (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
 - (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
 - (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
 - (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
 - (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
 - (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
 - (23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.
 - (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.*
-

BILAG 4E

»B.17. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 476 »In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

In vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan benyttes til at påvise genmutationer, som induceres af kemiske stoffer. Blandt egnede cellelinjer er muselymfocytter L5178Y, cellelinjerne CHO, CHO-AS52 og V79 fra kinesisk hamster og humane lymfoblastceller TK6 (1). I disse cellelinjer benyttes som genetiske end-points almindeligvis bestemmelse af mutationer ved thymidin-kinase (TK), hypoxantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HPRT) og et transgen af xanthin-guanin-fosforibosyl-transferase (XPRT). I TK-, HPRT- og XPRT-mutationstestene påvises forskellige spektre af genetiske hændelser. Med TK og XPRT kan der på grund af deres autosomale placering påvises genetiske hændelser (f.x. større deletioner), der ikke kan påvises ved HPRT-locus'et på X-kromosomer (2) (3) (4) (5) (6).

I in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer eller celledammer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning og den spontane mutationsfrekvenss stabilitet.

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en exogen metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændigt efterligne forholdene i pattedyr in vivo. Man må omhyggeligt undgå forhold, der fører til resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet. Positive resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet, kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoxicitet (7).

Testen benyttes til screening for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der er positive ved denne test, er carcinogene hos pattedyr, men korrelationen mellem denne test og carcinogenicitet er ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og stadig mere tyder på, at der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de tilsyneladende virker gennem andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller (6).

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Fremadmutation: En genmutation fra forældretypen til mutanten, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet.

Basesubstitutionsmutagen: Et stof, der fremkalder substitution af et eller flere DNA-basepar.

Læserammemutagen: Et stof, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Fenotypeekspressionsperiode: Et tidsrum, hvorunder uændrede genprodukter gradvis forsvinder fra nylig muterede celler.

Mutanthypighed: Antallet af observerede mutantceller divideret med antallet af levedygtige celler.

Relativ total vækst: Forøgelsen af celleantallet i et tidsrum, sammenlignet med en kontrolpopulation af celler; beregnes som produktet af suspensionsvæksten i forhold til den negative kontrol og klondannelseeffektiviteten i forhold til den negative kontrol.

Relativ suspensionsvækst: Forøgelsen af celleantallet i ekspressionsperioden i forhold til den negative kontrol.

Levedygtighed: De behandlede cellers klondannelseseffektivitet på tidspunktet for selektiv udpladning efter ekspressionsperioden.

Overlevelse: De behandlede cellers klondannelseseffektivitet ved udpladningen efter behandlingsperioden; overlevelsen udtrykkes normalt i forhold til overlevelsen i kontrolcellepopulationen.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Celler, som mangler thymidin-kinase TK på grund af fremadmutationen $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, er resistente over for de cytotoxiske virkninger af pyridinanalogen trifluorthymidin (TFT). Celler, som har thymidin-kinase, er følsomme over for TFT, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TFT, mens normale celler, der indeholder thymidin-kinase, ikke kan. På tilsvarende måde kan celler, der mangler HPRT eller XPRT, udvælges ved deres modstandsdygtighed over for henholdsvis 6-thioguanin (TG) og 8-azaguanin (AG). Hvis der i en af genmutationstestene med pattedyrceller testes et stof, der er baseanalogt med det selektive stof eller beslægtet hermed, må der først ses nøje på teststoffets egenskaber. Eksempelvis bør enhver mistanke om, at teststoffet har selektiv toksicitet over for mutantceller og ikke-mutantceller, undersøges. Det vil sige, at det selektive system/stofs egnethed skal bekræftes, når der testes stoffer, der kemisk er beslægtet med det selektive stof (8).

Celler i suspensionskultur eller enkeltlagskultur udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i et passende tidsrum, hvorefter der ved dyrkning i subkultur påvises cytotoxicitet og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxiciteten bestemmes sædvanligvis ved at måle kultureernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller deres relative totale vækst efter behandlingsperioden. De behandlede kulturer holdes så lang tid i vækstmediet, afhængigt af hvert valgt locus og celletype, at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal. Mutanthypigheden bestemmes ved udsåning af et kendt antal celler i et medium, der indeholder det selektive stof, til påvisning af mutantceller og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af klondannelseseffektiviteten (levedygtigheden). Efter en passende inkuberings tid tælles kolonierne. Mutanthypigheden afledes af antallet af mutantkolonier i det selektive medium og antallet af kolonier i det ikke-selektive medium.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. Præparater

1.4.1.1. Celler

En lang række cellelinjer lader sig anvende i denne test, herunder subkloner af L5178Y, CHO, CHO-AS52, V-79 og TK6-celler. For de celletyper, der benyttes i denne test, bør der være påvist følsomhed over for kemiske mutagener, høj klondannelseseffektivitet og stabil spontan mutationshyppighed. Cellerne bør kontrolleres for forurening med mycoplasma og bør ikke anvendes, hvis de er forurenede.

Testen bør tilrettelægges med forud fastlagt følsomhed og styrke. Antallet af celler, kulturer og koncentrationer af teststof bør afspejle disse valgte parametre (14). Det mindste antal levedygtige celler, der overlever behandling og benyttes i testens faser, baseres på den spontane mutationshyppighed. Som rettesnor kan der anvendes et celleantal, der er mindst ti gange den reciprokke spontane mutationshyppighed. Det anbefales dog, at der mindst anvendes 10^6 celler. Der skal foreligge tilstrækkelige historiske data om cellesystemet til at dokumentere, at testen har konstant høj effektivitet.

1.4.1.2. Medier og dyrkningsbetingelser

Der benyttes egnede dyrkningsmedier og inkuberingsbetingelser (dyrkningsbeholdere, temperatur, CO_2 -koncentration, luftfugtighed). Medier vælges efter, hvilke selektive systemer og celletyper der benyttes i testen. Det er især vigtigt at vælge sådanne dyrkningsbetingelser, at både mutantcellers og ikke-mutantcellers vækst og kolonidannelse bliver optimal under ekspressionsperioden.

1.4.1.3. Fremstilling af kulturer

Cellerne opformerer fra stamkulturer, udsås i dyrkningsmedium og inkuberes ved 37°C. Det kan være nødvendigt at rense kulturerne for allerede-eksisterende mutanter, inden de benyttes i denne test.

1.4.1.4. Metabolismeaktivering

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af lever fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) eller en blanding af phenobarbiton og β -naphthoflavon (19) (20).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10% (v/v) i det færdige testsubstrat. Valget af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5. Teststof/testpræparat

Teststoffer i fast form opløses eller oplægges i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i vækseform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. Opløsningsmiddel/bærestof

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmiddel/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes ved tilsætning af molekyli.

1.4.2.2. Eksponeringskoncentrationer

Stoffets cytotoxicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoxiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. relativ klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relativ total vækst. Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoxicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst fire analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytotoxicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højest er adskilt med en faktor mellem 2 og $\sqrt{10}$. Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoxicitet, bør den føre til en relativ overlevelse (relativ klondannelseseffektivitet) eller relativ total vækst på ca. 10-20% (ikke under 10%). For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højest være 5 μ l/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

Forholdsvis uopløselige stoffer testes op til eller over opløselighedsgrænsen ved dyrkningsbetingelserne. Tegn på uopløselighed bør konstateres i det endelige behandlingsmedium, som cellerne udsættes for. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler, S9, serum mv. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3. Kontrolprøver

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer.

Metabolismeaktivering	Locus	Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ingen exogen metabolismeaktivering	HPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små og store kolonier)	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Exogen metabolismeaktivering	HPRT	3-methylcholanthren	56-49-5
N-nitrosodimethylamin			62-75-9	200-549-8
7,12-dimethylbenzanthracen			57-97-6	200-359-5
TK (små og store kolonier)		Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-nitrosodimethylamin (ved højt indhold af S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyrene	50-32-8	200-028-5

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol, f.eks. kan et laboratorium, der har en historisk database over 5-brom-2'-deoxyuridin (CAS nr. 59-14-3, Einecs nr. 200-415-9), også benytte dette referencestof. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærestof, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3. Fremgangsmåde

1.4.3.1. Behandling med teststof

Celler under formering udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Eksponeringen skal være en passende tid (normalt har tre-fem timer den fornødne virkning). Eksponeringen kan strække sig over én eller flere celleyklusser.

Ved hver undersøgt koncentration benyttes der enten en eller to behandlede kulturer. Benyttes der kun én kultur, øges antallet af koncentrationer, således at der bliver tilstrækkeligt mange kulturer til analyse (dvs. mindst otte analyserbare koncentrationer). Der bør anvendes to negative kontrolkulturer (opløsningsmiddel).

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (21) (22).

1.4.3.2. Måling af overlevelse, levedygtighed og mutanthypighed

Efter eksponeringen vaskes cellerne og dyrkes med henblik på at bestemme overlevelsen og give mulighed for ekspression af mutantfænotypen. Måling af cytotoxicitet ved bestemmelse af kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relative totale vækst påbegyndes normalt efter behandlingsperioden.

Hvert locus har et fast mindste tidsrum, som kræves til nær optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede mutanter (HPRT og XPRT kræver mindst seks-otte dage og TK mindst to dage). Cellerne dyrkes i medier med og uden selektivt stof med henblik på bestemmelse af henholdsvis antallet af mutanter og klondannelseseffektiviteten. Måling af levedygtigheden (der benyttes til beregning af mutanthypigheden) påbegyndes efter ekspressionstiden ved udladning på ikke-selektivt medium.

Hvis teststoffet reagerer positivt i L5178Y TK^{+/-}-testen, bestemmes kolonistørrelsen i mindst en af testkulturerne (den højeste positive koncentration) og i de positive og negative kontrolkulturer. Hvis teststoffet reagerer negativt i L5178Y TK^{+/-}-testen, bestemmes kolonistørrelsen i de positive og negative kontrolkulturer. Også ved undersøgelser med TK6TK^{+/-} kan kolonistørrelsen bestemmes.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene skal omfatte bestemmelse af cytotoxicitet og levedygtighed, kimtælling og mutanthypighed for de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. I tilfælde af positiv reaktion i L5178Y TK^{+/-}-testen, bedømmes kolonierne ud fra kriterier om små og store kolonier ved mindst én koncentration af teststoffet (højeste positive koncentration) og med den negative og positive kontrol. Den molekylære og cytogenetiske natur af mutanter i både store og små kolonier er udforsket detaljeret (23) (24). I TK^{+/-}-testen bedømmes kolonierne efter kriterier for normalt voksende (store) og langsomt voksende (små) kolonier (25). De mutantceller, der har de mest alvorlige genetiske skader, har længere fordoblingstider og danner derfor mindre kolonier. Sådanne skader ligger typisk fra tab af hele genet til karyotypisk synlige kromosomaberrationer. Induktion af mutanter i små kolonier har været tilskrevet kemikalier, der fremkalder kromosomaberrationer, der kan ses med det blotte øje (26). Mindre alvorligt berørte mutantceller vokser med omtrent samme hastighed som modercellerne og danner store kolonier.

Overlevelsen (den relative klondannelseseffektivitet) eller den relative totale vækst skal oplyses. Mutanthypigheden opgives som antallet af mutantceller i forhold til antallet af overlevende celler.

Der anføres data for hver enkelt kultur. Derudover sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendigt, skal dette begrundes. Ved forsøg til opfølgning af tvetydige eller negative resultater bør man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktivering.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig eller reproducerbar forøgelse af mutanthypigheden. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for genmutation i pattedyrceller viser, at teststoffet fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller. En positiv koncentrationsafhængig reproducerbar respons er mest sigende. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes.

Celler:

- celletype og -kilde
- antal cellekulturer
- eventuelt antal passager
- eventuelle metoder til vedligehold af cellekultur
- fravær af mycoplasma

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoxicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger
- substratsammensætning og eventuel CO₂-koncentration
- teststoffets koncentration
- volumen af tilsat bærestof og teststof
- inkuberingstemperatur
- inkuberingstid
- behandlingens varighed
- celletæthed under behandlingen
- metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier
- positive og negative kontrolprøver
- ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)
- selektive agenser
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

- metoder til tælling af levedygtige celler og mutanceller
- definition af kolonier, hvor størrelse og type lægges til grund (herunder kriterier for, hvilke kolonier der er »små« og »store«)

Resultater:

- tegn på toksicitet
- tegn på udfældning
- data om pH og osmolalitet under udsættelsen for teststoffet, hvis disse værdier er målt
- kolonistørrelse, hvis den er bedømt, i hvert fald for negative og positive kontrolkulturer
- laboratoriets kapacitet til at påvise mutanter i små kolonier med L5178Y TK[±]-systemet
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- mutanthyppighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK⁺ - TK⁺ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res.*, 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) Mutants of L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res*, 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK⁺ - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.◀

BILAG 4F

»B.23. TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 483 »Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med in vivo-testen for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr er et påvise, om et stof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i spermatogonier fra pattedyr (1) (2) (3) (4) (5). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Den foreliggende metode er ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til det formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker.

Ved denne test måles kromosomhændelser i spermatogonier, og den forventes derfor at kunne forudsige induktion af arvelige mutationer i kimceller.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Ved denne cytogenetiske in vivo-test påvises kromosomaberrationer ved spermatogoniers mitose. Metoden omfatter ikke andre målceller.

For at påvise aberrationer af kromatidtypen i spermatogonier må den første mitotiske celledeling efter behandlingen undersøges, inden eventuelle skader går tabt ved efterfølgende celledelinger. Der kan indhentes yderligere information fra behandlede spermatogonstamceller ved meiotisk kromosomanalyse for aberrationer af kromosomtypen ved diakinese-metafase I, når de behandlede celler bliver til spermatocytter.

Denne in vivo-test er tilrettelagt til at vise, om stoffer, der er mutagene over for somatiske celler, også er aktive i kimceller. Derudover er spermatogontesten relevant for en vurdering af den reelle mutagenicitetsfare, idet der tages hensyn til sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser.

I testiklerne er der flere generationer af spermatogonier til stede, som udviser forskellig følsomhed over for kemisk behandling. På denne måde repræsenterer de påviste aberrationer den samlede reaktion fra behandlede spermatogonpopulationer, hvor resultatet domineres af de mere talrige differentierede spermatogonier. Forskellige generationer af spermatogonier er, alt efter deres placering i testiklerne, i varierende grad i berøring med det almindelige kredsløb på grund af den fysiske og fysiologiske Sertoli-cellebarriere og blod-testikelbarrieren.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Gap: en kromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtallet (n), som ikke er det diploide tal (dvs. $3n$, $4n$, osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af kinceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. Præparater

1.4.1.1. Valg af dyreart

Der benyttes sædvanligvis hanmus og -hamstere, selv om hanner af andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten.

1.4.1.2. Miljø og fodring

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3. Forberedelse af dyrene

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænses laboratorieforholdene i mindst fem dage.

1.4.1.4. Fremstilling af doser

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmnes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. Opløsningsmiddel/bærestof

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. Kontrolgrupper

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer i spermatogonier in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne.

Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer acrylamid	79-06-1	201-173-7
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med kromosom-afvigelse. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. Dyrenes antal

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr.

1.5.2. Behandlingsplan

Teststofferne indgives fortrinsvis ad én eller to gange (dvs. som én behandling eller to behandlinger). De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materiale volumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

I gruppen med højeste dosis udtages der prøver på to tidspunkter efter behandling. Da teststoffet kan indvirke på celleyklusens kinetik, udtages der er tidlig og en sen prøve, nemlig ca. 24 timer og ca. 48 timer efter behandlingen. For alle andre doser end den højeste dosis udtages en prøve 24 timer eller 1,5 gange celleyklus efter behandlingen, medmindre et andet prøveudtagningstidspunkt vides at være bedre egnet til påvisning af virkninger (6).

Der kan desuden udtages prøver på andre tidspunkter. For kemikalier, der kan fremkalde kromosom-lagging eller have S-uafhængige virkninger, kan tidligere prøveudtagning være hensigtsmæssigt (1).

Det vurderes i det enkelte tilfælde, om en behandlingsplan med gentagen indgift er velegnet. Ved behandling med gentagen indgift aflives dyrene 24 timer (1,5 celleykluslængde) efter sidste behandling. Der kan udtages yderligere prøver, hvis det er hensigtsmæssigt.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyr efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. tre-fem timer, for hamster ca. fire-fem timer.

1.5.3. Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (7). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningsstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død.

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i spermatogonier (f.eks. et lavere forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafaser; faldet må ikke være større end 50%).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet ved én eller i to behandlinger på samme dag, ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyale eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af kromosomer

Umiddelbart efter aflivningen udtages der celleopslemninger fra en eller begge testikler, som udsættes for hypotonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7. Analyse

For hvert dyr bør mindst 100 godt fordelte metafaseceller analyseres (dvs. mindst 500 metafaseceller pr. gruppe). Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromer svarende til kromosomtallet $2n \pm 2$.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af celler med strukturelle kromosomaberrationer, og antallet af kromosomaberrationer pr. celle bedømmes. Forskellige typer strukturelle kromosomaberrationer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed.

Hvis der iagttages såvel mitose som meiose, bestemmes forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase som et mål for cytotoxiciteten for alle behandlede dyr og negative kontrol dyr i en samlet prøve på 100 celler under deling for hvert dyr. Hvis der kun iagttages mitose, bestemmes mitoseindekset i mindst 1 000 celler for hvert dyr.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkelt dosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (8). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en *in vivo*-test for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr viser, at teststoffet fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet, bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme
- antal dyr og deres alder
- oprindelse, miljø, føde, mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- begrundelse for indgiftsvej
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet
- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for aflivningstidspunkter

- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til måling af toksicitet
- det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed
- metoder til præparering af objektglas
- kriterier for bedømmelse af aberrationer
- antal analyserede celler pr. dyr
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

- tegn på toksicitet
- mitoseindeks
- forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase
- antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr
- samlet antal aberrationer pr. gruppe
- antal celler med aberrationer pr. gruppe
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- data for sideløbende negative kontrolprøver
- data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser
- data for sideløbende positive kontrolprøver
- eventuelt iagttagne ploidiændringer

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207-209.
 - (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
 - (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.^a
-

BILAG 4G

»B.39. TEST FOR UNSCHEDULED DNA-SYNTSE (UDS) MED PATTEDYRLEVERCELLER IN VIVO

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 486 »Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo« (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med testen for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo er at påvise, om et teststof inducerer DNA-reparation i levercellerne hos de behandlede dyr (1) (2) (3) (4).

Denne in vivo-test indeholder en metode til undersøgelse af kemikaliers gentoksiske virkninger i leveren. Det målte endpoint er tegn på DNA-beskadigelse og deraf følgende reparation i leverceller. Leveren er normalt det sted, hvor absorberede stoffer først og fremmest metaboliseres. Den er derfor et egnet sted til in vivo-måling af DNA-beskadigelse.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet ikke vil nå frem til målvævet, er denne tekst ikke egnet.

Endpoint for unscheduled DNA-syntese (UDS) måles ved at bestemme optagelsen af mærkede nukleosider i celler, hvor der ikke foregår planmæssig DNA-syntese (S-fase). Den mest benyttede teknik består i at bestemme optagelsen af tritiummærket thymidin (^3H -TdR) ved autoradiografi. Der bør fortrinsvis benyttes rottelever i UDS-test in vivo. Der kan benyttes andet væv end levervæv, men det er ikke omfattet af denne metode.

Påvisningen af et UDS-respons afhænger af, hvor mange DNA-baser der er skåret ud og erstattet på det beskadigede sted. Derfor er UDS-testen særlig værdifuld til påvisning af stoffremkaldt »longpatch repair« (20-30 baser). Til gengæld er følsomheden over for »shortpatch repair« (1-3 baser) meget lavere. Endvidere kan der optræde mutagene hændelser som følge af manglende reparation, forkert reparation eller forkert replikation af DNA-skader. UDS-metodens reaktion er ikke noget mål for, i hvor høj grad reparationsprocessen er lykkedes. Ydermere er det muligt, at et mutagen reagerer med DNA, men at DNA-beskadigelsen ikke repareres ved en udskæringsreparationsproces. De beskedne specifikke oplysninger om mutagen aktivitet, som UDS-testen giver, opvejes af, at dens endpoint potentielt har høj følsomhed, eftersom det måles i hele genomet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Celler under reparation: Et NNG-tal, der er højere end en forud fastsat værdi, som det laboratorium, der udfører testen, skal begrunde.

Nettokernekorner (NNG): Kvantitativt mål for cellers UDS-aktivitet ved en autoradiografisk UDS-test; tallet beregnes ved at trække gennemsnitsantallet af cytoplasmakorn i kerneækvivalente områder af cytoplasmaet (CG) fra antallet af kernekorner (NG), dvs. $\text{NNG} = \text{NG} - \text{CG}$. NNG-tallet beregnes for den enkelte celle, hvorefter tallene samles i puljer for celler i samme kultur, for parallelle kulturer osv.

Unscheduled DNA-syntese (UDS): DNA-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en DNA-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testen med pattedyrleverceller in vivo viser DNA-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en DNA-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger. Testen baseres sædvanligvis på indsætning af ^3H -TdR i DNA'et i leverceller, hvor der er lav forekomst af celler i cellecyklussens S-fase. Optagelse af ^3H -TdR bestemmes normalt ved autoradiografi, eftersom denne teknik, i modsætning til f.eks. væskescintillation, ikke er følsom over for interferens fra celler i S-fase.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene.

1.4.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller oplægges i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I hver individuelt gennemført del af forsøget medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolstoffer bør være stoffer, der vides at fremkalde UDS, når de indgives i en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Positive kontrolstoffer, der kræver metabolis- meaktivering, bør benyttes i doser, der frembringer moderat reaktion (4). Doserne kan vælges på en sådan måde, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Prøveudtagnings-tidspunkt	Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Tidlig prøveudtagning (2-4 timer)	N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Sen prøveudtagning	N-2-fluorenylaceta- mid	53-96-3	200-188-6

Der kan anvendes andre egnede positive kontrolstoffer. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. Dyrenes antal og køn

Der anvendes tilstrækkelig mange dyr til, at der er taget hensyn til den naturlige variation i reaktionerne på testen. Der skal være mindst tre analyserbare dyr i hver gruppe. Er der indsamlet en betydelig historisk database, kræves der kun et eller to dyr i sideløbende negative og positive kontrolgrupper.

Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn, helst hanner, tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. Behandlingsplan

Teststofferne indgives normalt i en enkelt behandling.

1.5.3. Dosisniveauer

Normalt benyttes der to dosisniveauer. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Normalt bør laveste dosis være mellem 50% og 25% af den højeste dosis.

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen.

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i leveren (f.eks. pyknotiske kerner).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, er en fuldstændig undersøgelse muligvis ikke nødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyale. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Intraperitoneal injektion anbefales ikke, da leveren derved kan udsættes for teststoffet direkte og ikke via kredsløbet. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af leverceller

Leverceller fra behandlede dyr præpareres normalt 12-16 timer efter indgiften. Medmindre reaktionen på dette tidspunkt er tydeligt positiv, er desuden yderligere en tidlig prøveudtagning (normalt to-fire timer efter indgiften) sædvanligvis påkrævet. Andre tidspunkter for prøveudtagning kan benyttes, når de kan begrundes med toksikokinetiske data.

Korttidskulturer af pattedyrleverceller etableres sædvanligvis ved perfusion af leveren in situ med collagenase, idet man lader frisk dissocierede leverceller sætte sig fast på en egnet flade. Leverceller fra negative kontroldyr skal have en levedygtighed (5) på mindst 50%.

1.5.7. Bestemmelse af UDS

Nyligt isolerede pattedyrleverceller inkuberes normalt i et medium, der indeholder $^3\text{H-TdR}$ i et passende tidsrum, f.eks. tre-otte timer. Når inkubationstiden er afsluttet, fjernes mediet fra cellerne, som dernæst kan inkuberes i et medium, der indeholder overskud af u mærket thymidin, så ikke-indbygget radioaktivitet («cold chase») bliver mindst mulig. Cellerne skylles, fikseres og tørres. Ved længere inkuberingstider er «cold chase» ikke altid nødvendigt. Objektglassene dyppes i autoradiografiemulsion, eksponeres i mørke (f.eks. i køleskab i 7-14 dage), fremkaldes og farves, og de eksponerede sølvkorn tælles. Der fremstilles to-tre objektglas pr. dyr.

1.5.8. Analyse

De præparerede objektglas skal indeholde tilstrækkelig mange celler med normal morfologi til, at der kan foretages en meningsfyldt vurdering af UDS. Præparaterne undersøges mikroskopisk for tegn på åbenlys cytotoxicitet (f.eks. pyknose eller nedsat radioaktiv mærkning).

Objektglassene kodes, inden kornene tælles. Normalt bedømmes der 100 celler fra hvert dyr på mindst to objektglas; bedømmelse af mindre end 100 celler pr. dyr skal begrundes. Der tælles ikke korn for celler i S-fase, men andelen af celler i S-fase kan registreres.

Den mængde $^3\text{H-TdR}$, der indbygges i kerner og cytoplasma i morfologisk normale celler, og som giver sig udtryk i afsættelse af sølvkorn, bestemmes med egnede metoder.

Der foretages korntælling over kernerne (kerne-korn, NG) og kerneækvivalente områder over cytoplasmaet (cytoplasma-korn, CG). CG-tallene fremkommer enten ved at tage de kraftigst mærkede cytoplasmaområder eller ved at tage gennemsnittet af to-tre tilfældigt foretagne tællinger af cytoplasma-korn i nærheden af kernerne. Der kan benyttes andre tællemetoder (f.eks. helcelletælling), hvis de kan begrundes (6).

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene præsenteres for hvert enkelt objektglas og hvert enkelt dyr. Desuden sammenfattes alle data i tabel-form. For hver celle, hvert dyr og hver dosis og tidspunkt beregnes tallet for nettokernekorn (NNG) ved at trække CG-tallene fra NG-tallene. Hvis der tælles «celler under reparation», skal de kriterier, der benyttes til definering af «celler under reparation», begrundes og underbygges med tidligere og sideløbende negative kontroldata. Talresultater kan evalueres ved statistiske metoder. Eventuelt benyttede statistiske test skal vælges og begrundes, inden undersøgelsen gennemføres.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Nedenfor følger nogle eksempler på kriterier for positiv/negativ reaktion:

- | | | |
|---------|------|--|
| positiv | (i) | NNG-værdier, der er højere end en forud fastsat tærskelværdi, som er begrundet med udgangspunkt i laboratoriets tidligere data |
| eller | (ii) | NNG-værdier, der er signifikant større end sideløbende kontrol. |
| negativ | (i) | NNG-værdier, der er inden for eller under en kontroltærskelværdi, der bygger på tidligere resultater |
| eller | (ii) | NNG-værdier, der ikke er signifikant større end sideløbende kontrol |

Dataenes biologiske relevans skal tages i betragtning, f.eks. sådanne parametre som variation mellem dyr, sammenhæng mellem dosis og respons og cytotoxicitet. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en test for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo viser, at teststoffet inducerer DNA-skader i pattedyrleverceller in vivo, som kan repareres ved unscheduled DNA-syntese in vivo. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke inducerer DNA-skader, der kan påvises ved denne test.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

- begrundelse for valg af bærestof
- teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

- anvendt art/stamme
- antal dyr og deres alder og køn
- oprindelse, miljø, føde, mv.
- de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

- positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper
- data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval
- begrundelse for valg af dosisniveau
- detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet
- detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet
- begrundelse for indgiftsvej
- eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet
- eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)
- detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet
- detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan
- metoder til måling af toksicitet
- metoder til præparering og dyrkning af leverceller
- anvendt autoradiografiteknik

- antal præparerede objektglas og antal bedømte celler
- evalueringskriterier
- kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

- gennemsnitsværdier af kernekorn, cytoplasmakorn og nettokernekorn for hvert enkelt objektglas, dyr og gruppe
- dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt
- eventuelle statistiske analyser
- tegn på toksicitet
- data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver
- data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelse
- antal »celler under reparation«, hvis det er bestemt
- antal celler i S-fase, hvis det er bestemt
- cellernes levedygtighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 12-133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutations Res.*, 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553-562.

BILAG 5

SV:

3.2.3. Farligt

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

Flytande ämnen och beredningar som på grund av sin låga viskositet utgör en fara för människa vid aspiration

a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration av 10% eller mer och

- har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utloppsägare enligt ISO 2431, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

Ämnen och beredningar, som uppfyller dessa kriterier, behöver dock inte klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning högre än 33 mN/m vid 25 °C, uppmätt med en Noüy tensiometer eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

b) För ämnen och beredningar, baserat på praktiska erfarenheter från människa.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den DE version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

FI:

3.2.6.1 Ihon tulehtuminen

Seuraava vaaraa osoittava lauseka määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

— Aineet ja valmisteet aiheuttavat ihon merkittävän tulehtumisen enintään neljän tunnin altistuksessa määrättyinä kanilla liitteessä V mainitulla ihoärsyttestillä. Tulehdus kestää vähintään 24 tuntia.

Ihon tulehdus on merkittävää, jos:

- a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;
- b) tai kun liitteessä V tarkoitettua testiä on täydennetty käyttämällä kolmea koe-eläintä, vähintään kahden koe-eläimen ihon punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo on, jokaiselle koe-eläimelle laskettuna erikseen, vähintään 2.

Kummassakin tapauksessa keskiarvojen lasekmiseen on käytettävä kaikkia niitä lukuarvoja, jotka saadaan arvioitaessa vaikutusta 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin välein.

Tulehdusta pidetään myös merkittävänä, jos ihon tulehtuminen jatkuu ainakin kahdella koe-elämellä havainnointiajan päättymiseen asti. Erityiset vaikutukset kuten esimerkiksi hyperplasia, hilseileminen, värin muutokset, halkeamat, ruvet ja karvojenlähtö on otettava huomioon.

Tähän liittyviä tietoja voidaan saada myös eläimillä tehtävistä ei-akuuttisista altistuskokeista (katso lauseketta R48 koskevat huomautukset jaksossa 2.d). Vaikutuksia pidetään merkittävänä, jos ne vastaavat edellä kuvattuja vaikutuksia.

- Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.
- Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha ('paresthesia'):

Pyretroiditorjunta-aineen ihokosketuksen aiheuttamaa tuntoharhaa ihmisessä ei pidetä ärsytysvaikutuksena, joka oikeuttaisi luokituksen Xi; R38. S-lauseketta S24 on kuitenkin sovellettava aineisiin, joilla on tällainen vaikutus.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den DE version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den SV version)

I punkt 6.2 (Sikkerhedssætninger for stoffer og præparater):

DE:

S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)

- Anwendungsbereich:
 - sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;
- Verwendung:
 - *obligatorisch* für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;
 - empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, insbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;
 - empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den FI version)

(Vedrører ikke den SV version)

FI:

S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin

— Soveltamisala:

- erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,
- erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,
- ympäristölle vaaralliset aineet.

— Käytön perusteet:

- *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,
- suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Vedrører ikke den ES version)

(Vedrører ikke den DA version)

(Vedrører ikke den DE version)

(Vedrører ikke den EL version)

(Vedrører ikke den EN version)

(Vedrører ikke den FR version)

(Vedrører ikke den IT version)

(Vedrører ikke den NL version)

(Vedrører ikke den PT version)

(Vedrører ikke den SV version)

—

BILAG 6

»BILAG IX

DEL A

Bestemmelser vedrørende børnesikrede lukninger

Ud over bestemmelserne i dette direktivs artikel 22, stk. 1, litra e), skal beholdere, der indeholder stoffer, som udgør en aspirationsfare (Xn; R65) og klassificeres og mærkes efter punkt 3.2.3 i bilag VI til dette direktiv, uanset deres rumindhold være forsynet med børnesikret lukning. Dette gælder dog ikke stoffer, der markedsføres som aerosoler eller i beholdere med forseglede sprayanordning.

1. *Emballage, som kan lukkes igen*

Børnesikrede lukninger på emballage, som kan lukkes igen, skal være i overensstemmelse med ISO-standard 8317 (1. juli 1989) for »Emballage. Børnesikret emballage. Krav og prøvningsmetoder for genlukkelig emballage«, som er vedtaget af Den Internationale Standardiseringsorganisation (ISO).

2. *Emballage, som ikke kan lukkes igen*

Børnesikrede lukninger på emballage, som ikke kan lukkes igen, skal være i overensstemmelse med CEN-standard EN 862 (marts 1997) for »Emballage. Børnesikret emballage. Krav til og prøvningsprocedurer for ikke-genlukkelige emballager til ikke-farmaceutiske produkter«, som er vedtaget af Den Europæiske Standardiseringsorganisation (CEN).

3. *Bemærkninger*

1. Overensstemmelse med disse standarder kan kun attesteres af laboratorier, som opfylder den europæiske standard EN 45 000.

2. *Særlige tilfælde*

Hvis det er indlysende, at emballagen er tilstrækkelig sikker for børn, fordi børn ikke kan få adgang til indholdet uden at bruge værktøj, er det ikke nødvendigt at foretage afprøvning.

I alle andre tilfælde, og hvis der er grund til at tvivle på, at lukningen er sikker for børn, kan de nationale myndigheder bede den ansvarlige for markedsføringen forelægge en attest fra et laboratorium, som svarer til beskrivelsen under 3.1, til bevis på:

- at lukningen er af en sådan art, at det ikke er nødvendigt at afprøve dens overensstemmelse med de ISO- og CEN-standarder, der omtales i det foregående, eller
- at lukningen er blevet afprøvet og har vist sig at opfylde den standard, der omtales i det foregående.

DEL B

Bestemmelser for følbare advarselsmærkning

De tekniske specifikationer for følbare advarselsmærkning skal være i overensstemmelse med EN ISO standard 11683 (1997) for følbare advarselsmærkning: »Emballage — Følbare advarsel — Krav«.

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2000/33/EF**af 25. april 2000****om 27. tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer (*)**

(EØS-relevant tekst)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer⁽¹⁾, senest ændret ved Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/33/EF⁽²⁾, særlig artikel 28, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Bilag V til direktiv 67/548/EØF indeholder metoderne til bestemmelse af stoffers og præparaters fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet. Det er nødvendigt at tilpasse dette bilag til den tekniske udvikling.
- (2) I artikel 7, stk. 2, i Rådets direktiv 86/609/EØF om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om beskyttelse af dyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål⁽³⁾, fastsættes, at »forsøg må ikke udføres, hvis der på rimelig og praktisk måde kan benyttes en anden videnskabeligt tilfredsstillende metode, som ikke medfører anvendelse af dyr, for at opnå de tilstræbte resultater«.
- (3) Kommissionen har til hensigt at indføre alternative prøve-metoder, som ikke medfører anvendelse af dyr, i bilag V til direktiv 67/548/EØF, således at disse metoder kan anvendes til prøvning af kemiske stoffer i overensstemmelse med artikel 3, stk. 1, i direktiv 67/548/EØF.
- (4) De i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for Tilpasning til den Tekniske Udvikling af Direktiverne om Fjernelse af Tekniske Hindringer for Handelen med Farlige Stoffer og Præparater —

Artikel 1

Teksterne i bilag I og II til dette direktiv tilføjes til del B i bilag V til direktiv 67/548/EØF.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne gennemfører senest den 1. oktober 2001 de love og administrative bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv. Medlemsstaterne underretter straks Kommissionen herom.

Disse love og bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen de vigtigste nationale lovbestemmelser, som de vedtager på det område, der er omfattet af dette direktiv, og en sammenligningstabel mellem dette direktiv og de vedtagne nationale bestemmelser.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tredjedagen for dets offentliggørelse i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. april 2000.

På Kommissionens vegne
Margot WALLSTRÖM
Medlem af Kommissionen

(*) Udstedt før den 26. tilpasning.

⁽¹⁾ EFT 196 af 16.8.1967, s. 1.

⁽²⁾ EFT L 199 af 30.7.1999, s. 57.

⁽³⁾ EFT L 358 af 18.12.1986, s. 1.

BILAG I

»B.40. HUDÆTSNING

1. METODE

1.1. Indledning

To in vitro-test til måling af hudætsning er blevet anerkendt som videnskabeligt validerede af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM, Det Fælles Forskningscenter, Europa-Kommissionen) (1) (2) (3): måling af transkutan elektrisk modstand (TER) i rottehud og en test, hvor der anvendes en human hudmodel. ECVAM-valideringsundersøgelsen viste, at begge testmetoder var pålidelige med hensyn til at kunne skelne mellem stoffer, der er kendt for at være hudætsende, og stoffer, der er kendt for ikke at være det. Derudover kunne man med forsøgsprotokollen baseret på en human hudmodel skelne korrekt mellem grader af hudætsning (stoffer, der er kendt for at være alvorligt hudætsende, R35, og andre hudætsende stoffer, R34) (2). Beskrivelse og fremgangsmåde for begge metoder er anført nedenfor; valg af test afhænger af brugerens specifikke behov og præferencer.

Se desuden den generelle indledning, del B.

1.2. Definitioner

Hudætsning: fremkomsten af irreversibel vævsødelæggelse i huden efter applikation af teststof.

1.3. Referencestoffer

Ingen nærmere angivet, men se punkt 1.5.3.4 og 1.7.2.3.

1.4. Princippet i testmetoden — Rottehud-TER-testen

Testmaterialet appliceres i op til 24 timer på den epidermale overflade (ydersonen af huden) af hudlapper fra unge rotter, der er humant aflivede. At et stof er ætsende, viser sig ved, at det kan beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion, hvilket kan måles som en reduktion i den naturlige TER under en tærskelværdi (5 k Ω) (4) (5). Irriterende og ikke-irriterende stoffer medfører ikke TER under tærskelværdien. Et farvebindingstrin kan føjes til testen ved undersøgelser af overfladeaktive stoffer og neutrale organiske stoffer (se definitioner i reference 6); herved mindskes antallet af falsk positive resultater, som særligt forekommer ved disse stoffer (2) (7).

1.5. Beskrivelse af testmetode — Rottehud-TER-testen

1.5.1. Forsøgsdyr

Til fremstilling af hudlapper anvendes unge rotter (20-23 dage gamle, Wistar eller lignende stamme). Hårene på ryggen og flanken fjernes omhyggeligt med en lille dyresaks. Dyrene vaskes dernæst omhyggeligt, idet det pågældende hudområde holdes neddyppet i en opløsning af antibiotika (f.eks. streptomycin, penicillin, chloramphenicol og amphotericin i koncentrationer høje nok til at hæmme bakterievækst). Forsøgsdyrene vaskes igen med antibiotika på tredje- og fjerdedagen efter den første vask og skal derefter anvendes inden tre dage. (Dyrene må ikke være ældre end 31 dage med henblik på fremstilling af hudlapper).

1.5.2. Fremstilling af hudlapper

Forsøgsdyrene aflives humant. Ryghuden fjernes fra dyrene og overflødig fedtvæv fjernes omhyggeligt. Huden anbringes for enden af et rør af PTFE (polytetrafluorethylen), idet man sikrer sig, at den epidermale overflade er i kontakt med røret. En gummi »O«-ring sættes tætsluttende omkring rørets ende for at holde huden på plads, og overflødig væv klippes af. Rørets og »O«-ringens dimensioner ses på figur 1. Der tætnes med vaseline, så »O«-ringen slutter helt til enden af PTFE-røret. Røret fastholdes ved hjælp af fjederklemmer i et ydre kammer, som indeholder en magnesiumsulphatopløsning (154 mM) (figur 2).

1.5.3. Fremgangsmåde

1.5.3.1. Applikation af testmaterialet

Flydende teststoffer (150 μ l) appliceres på den epidermale overflade inde i røret (figur 2). Drejer det sig om faste stoffer, skal tilstrækkeligt af stoffet påføres hudlappen, så hele overfladen er dækket af stoffet. Deioniseret vand (150 μ l) tilsættes oven på stoffet, og røret rystes forsigtigt. Teststoffet skal have maksimal kontakt med huden. Med henblik herpå kan det være nødvendigt at opvarme visse faste stoffer til 30 °C, så de smelter, eller rive dem til et kornet materiale eller male dem til pulver.

Der bruges tre hudlapper til hvert teststof. Stofferne skal være i kontakt med hudlappen i 24 timer (se ligeledes 1.5.3.4). Stoffet fjernes ved spuling under vandhane med vand med en temperatur på højst 30°C, indtil der ikke kan fjernes mere af stoffet. Stoffer, der er stivnet i røret, kan eventuelt fjernes ved hjælp af en kraftig stråle vand, der er omkring 30°C varmt.

1.5.3.2. TER-målinger

TER måles ved hjælp af en lavvoltagestrømsdatabro (f.eks. AIM 401 eller 6401 eller tilsvarende). Før den elektriske modstand måles, reduceres hudens overfladespænding ved tilsætning af 70% ethanol i tilstrækkelig mængde, så hele hudens overflade dækkes. Efter nogle få sekunder fjernes ethanolet, ved at man vender røret på hovedet, og vævet hydreres nu ved tilsætning af 3 ml magnesiumsulphatopløsning (154 mM). Elektroderne fra databroen anbringes nu på hver sin side af hudlappen for at måle modstanden i k Ω /hudlap (figur 2). Elektrodedimensioner og længden af elektroderne under krokodillenæbbene ses i figur 1. Klemmen (krokodillenæbbet) på den indre (tykke) elektrode hviler på toppen af PTFE-røret under selve modstandsmålingen, hvorved man sikrer sig, at et konstant stykke af elektroden er neddykket i opløsningen af magnesiumsulphat. Den ydre (tynde) elektrode er anbragt inde i det ydre kammer, så det rører ved kammerbunden. Afstanden mellem den nederste del af den fjedrende klemme og bunden af PTFE-røret skal holdes konstant, da den har indflydelse på den målte modstand.

Bemærk, at målinger på over 20 k Ω kan skyldes, at teststoffet ligger som en belægning på hudens overflade. Man kan forsøge at fjerne stoffet ved at ryste PTFE-røret i 10 sekunder, mens man dækker åbningen med en tommelfinger iført en gummitut; magnesiumsulphatopløsningen kasseres, og målingen gentages med en ny magnesiumsulphatopløsning.

Gennemsnittet af TER-resultaterne accepteres, dersom værdierne af samtidigt udførte positive og negative kontroller falder inden for de for metoden accepterede grænser. For metode og apparatur, som beskrevet her, er de foreslåede kontrolstoffer og de dertil hørende accepterede grænser:

Kontrol	Stof	Modstandsgrænser (k Ω)
Positiv	10 M saltsyre (36%)	0,5-1,0
Negativ	Destilleret vand	10-25

1.5.3.3. Procedure tilpasset overfladeaktive og neutrale organiske stoffer

Hvis TER-værdierne for overfladeaktive eller neutrale organiske stoffer er mindre end eller lig med 5 k Ω , kan man undersøge et farvestofs evne til at trænge ned i vævet. Herved kan man afgøre, om resultaterne er falsk positive (2).

1.5.3.3.1. Applikation og fjernelse af farvestoffet sulforhodamin B

Efter at den epidermale overflade er blevet behandlet med teststoffet, appliceres 150 μ l af en 10% (w/v)-opløsning af sulforhodamin B i destilleret vand på den epidermale overflade af hver hudlap i 2 timer. Hudlapperne spules under en vandhane i ca. 10 sekunder med vand, der ikke er varmere end stuetemperatur, for at fjerne overskydende/ikke-bundet farvestof. Hver hudlap fjernes omhyggeligt fra PTFE-røret og anbringes i et glas (f.eks. et 20 ml-glas til scintillationsmålinger) indeholdende deioniseret vand (8 ml). Glassene rystes forsigtigt i 5 minutter for at fjerne yderligere overskydende/ikke-bundet farvestof. Denne renseprocedure gentages, hvorefter hudlapperne fjernes og anbringes i glas, der indeholder 5 ml af en 30% (w/v)-opløsning af natriumdodecylsulphat (SDS) i destilleret vand. Glassene inkuberes ved 60°C til næste dag. Efter inkubationen fjernes og kasseres hudlapperne, og den tilbageværende opløsning centrifugeres i 8 minutter ved 21°C (relativ centrifugalkraft \sim 175). 1 ml af supernatanten fortyndes 1 til 5 (v/v) (1 ml+4 ml) med en 30% (w/v) SDS-opløsning i destilleret vand. Opløsningens ekstinktion/optical density (OD) måles ved ca. 565 nm.

1.5.3.3.2. Beregning af farveindhold

Mængden af sulforhodamin B pr. hudlap beregnes ud fra OD-værdierne (sulforhodamin B's molære ekstinktionskoefficient ved 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekylvægten = 580). Mængden af sulforhodamin B beregnes for alle hudlapperne, og en gennemsnitlig mængde beregnes ud fra tredobbelbestemmelserne. Den gennemsnitlige værdi for farvemængde accepteres under forudsætning af, at samtidigt opnåede kontrolværdier falder inden for de for metoden acceptable grænser. Følgende acceptable grænser for farvemængde i kontrollerne er foreslået for metode og apparat som beskrevet her:

Kontrol	Stof	Farvemængdegrænser (µg/lap)
Positiv	10 M saltsyre (36%)	40-100
Negativ	Destilleret vand	15-35

1.5.3.4. Yderligere informationer

Teststoffer kan også appliceres på hudlapper i kortere tid (f.eks. 2 timer) med henblik på identifikation af stærkt ætsende stoffer. Man fandt imidlertid ved valideringsundersøgelserne af TER-testen, at den overvurderede adskillige stoffers ætsende evne, når de var applicerede på hudlapper i 2 timer (2), skønt den efter 24 timers applikation korrekt kunne identificere de ætsende og de ikke-ætsende stoffer.

Testapparaturets og forsøgsprocedurens egenskaber og dimensioner kan have indflydelse på de opnåede TER-værdier. Tærskelværdien for ætsning, 5 kΩ, blev bestemt med det apparatur og den fremgangsmåde, der er beskrevet i denne metode. Hvis testbetingelserne ændres betydeligt, kan der blive tale om andre tærskel- og kontrolværdier. Det anbefales derfor, at metoden og tærskelværdien for modstand kalibreres ved at teste en række referencestandarder, der vælges blandt de kemikalier, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen (3).

1.6. Testmetodens princip — Måling ved forsøgsopstilling med human hud

Teststoffet appliceres i op til 4 timer på en tredimensional human hudmodel, omfattende en rekonstrueret epidermis med et fungerende stratum corneum. Ætsende stoffer identificeres ved deres evne til at nedsætte cellers levedygtighed (f.eks. påvist med MTT-reduktionstesten) under en fastlagt tærskelværdi efter en bestemt eksponeringstid. Testmetodens princip er i overensstemmelse med den hypotese, der siger, at kemikalier er ætsende, når de er i stand til at trænge gennem stratum corneum (ved diffusion eller erosion), og er tilstrækkeligt cytotoxiske til at fremkalde celledød i de underliggende cellelag.

1.7. Beskrivelse af testmetoden — Forsøgsopstilling med human hud

1.7.1. Modeller for human hud

Modeller for human hud kan hidrøre fra forskellige kilder, men de må opfylde visse kriterier. Modellen må have et fungerende stratum corneum med et underliggende lag af levende celler. Stratum corneums barrierefunktion må være tilstrækkelig. Dette kan vises ved, at hudmodellen ikke påvirkes af stoffer, der er cytotoxiske, men som ikke almindeligvis passerer stratum corneum. Modellens resultater skal være reproducerbare på veldefinerede betingelser.

De levende celler i modellen skal være tilstrækkelig levedygtige til, at de kan skelne klart mellem positive og negative kontroller. Efter at være udsat for en negativ kontrol skal cellernes levedygtighed (f.eks. som den kan måles med mængden af MTT-reduktion, dvs. en OD-værdi) være inden for acceptable grænser for den pågældende model. Vigtigst er det, at den anvendte model, der skal udsige noget om stoffers virkning, må have vist at kunne leve op til internationale valideringsstandarder (se reference 2).

1.7.2. Fremgangsmåde

1.7.2.1. Applikation af teststoffet

For flydende stoffer skal der appliceres tilstrækkeligt teststof til, at hudoverfladen dækkes (mindst 25 µl/cm²). Det samme gælder for faste stoffer, og de skal fugtes, for at sikre god hudkontakt; om nødvendigt skal de males til et pulver, før de appliceres. Applikationsmåden skal kunne anvendes til en lang række kemiske stoffer (for eksempler se reference 2). Teststoffet skal omhyggeligt vaskes af hudoverfladen med fysiologisk saltvand, når eksponeringstiden er gået.

1.7.2.2. Måling af cellers levedygtighed

Enhver kvantitativ, godkendt metode kan bruges til måling af cellers levedygtighed. Den hyppigst anvendte måling er MTT-reduktionstesten, som har vist sig at give nøjagtige og reproducerbare resultater i forskellige laboratorier (2). Hudlappen anbringes i en MTT-opløsning på 0,3 mg/ml ved 20-28°C i 3 timer. Den bundfældede blå formazan ekstraheres (ekstraktion med opløsningsmidler), og formazankoncentrationen beregnes ud fra måling af OD ved en bølgelængde mellem 545 og 595 nm.

1.7.2.3. Yderligere information

Den anvendte hudmodel og nøje overholdelse af applikationstid og vaskeprocedurer etc. har den største betydning for den målte cellelevedygtighed. Det anbefales, at metoden og modellen, der skal udsige noget om stoffers virkning, kalibreres med en serie standardreferencer, valgt blandt de kemikalier, der er brugt i ECVAM's valideringsundersøgelse (3). Kritisk er intra- og interlaboratoriel reproducerbarhed hvad angår en lang række kemikalier, i overensstemmelse med internationale standarder. Som et minimumskrav skal metoden leve op til kriterierne for videnskabelig gyldighed, som tidligere defineret (2), og resultaterne af en sådan valideringsundersøgelse skal være publicerede i et videnskabeligt tidsskrift med peer-review.

2. DATA

2.1. Behandling af resultaterne

2.1.1. Rottehud-TER-testen

De målte resultater for modstand ($k\Omega$) i teststoffet, i positive og negative kontroller og alle standardreferencekemikalierne skal meddeles i tabelform, heri også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og den deraf følgende klassifikation.

2.1.2. Test med human hudmodel

OD-værdier og beregnede tal for procentuel cellelevedygtighed for teststof, for positive og negative kontroller og for alle standardreferencekemikalier skal meddeles i tabelform, heri også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og den deraf følgende klassifikation.

2.2. Evaluering og fortolkning af resultater

2.2.1. Rottehud-TER-testen

Hvis den gennemsnitlige TER-værdi for teststoffet er større end 5 $k\Omega$, er stoffet ikke ætsende. Hvis TER-værdien er mindre end eller lig med 5 $k\Omega$, og stoffet ikke er et overfladeaktivt stof eller et neutralt organisk stof, er det ætsende.

Hvis TER-værdierne for overfladeaktive eller neutrale organiske stoffer er mindre end eller lig med 5 $k\Omega$, kan man undersøge et farvestofs evne til at trænge ned i vævet. Hvis det gennemsnitlige farveindhold i hudlappen er større end eller lig med det gennemsnitlige farveindhold i den sideløbende positive kontrol udført med 36% HCl, er teststoffet en sand positiv og derfor ætsende. Hvis det gennemsnitlige farveindhold i hudlappen er mindre end det gennemsnitlige farveindhold i den sideløbende positive kontrol udført med 36% HCl, er teststoffet en falsk positiv og derfor ikke ætsende.

2.2.2. Test med human hudmodel

OD fra den negative kontrol repræsenterer 100% cellelevedygtighed; derfor kan de OD-værdier, som måles ved hver undersøgelse, anvendes til beregning af den procentuelle levedygtighed i forhold til den negative kontrol. Den procentuelle cut-off værdi af cellelevedygtighed, som adskiller ætsende fra ikke-ætsende stoffer (eller som skelner mellem forskellige grader af ætseevne), skal klart defineres i forbindelse den anvendte model, der skal udsige noget om stoffers virkning, før metoden godkendes, og den påfølgende valideringsundersøgelse må vise, at cut-off-værdien er hensigtsmæssig (for eksempel se reference 2).

3. FREMLÆGGELSE AF RESULTATER

Testrapport

Testrapporten skal som et minimum indeholde følgende oplysninger:

Teststof

— Identifikation, data, dets fysiske natur og, hvis relevant, fysisk-kemiske egenskaber. Tilsvarende information skal foreligge for eventuelle referencestoffer

Omstændigheder ved testen

— Detaljer i den anvendte fremgangsmåde

— Beskrivelse af og motivering for eventuelle modifikationer.

Resultater

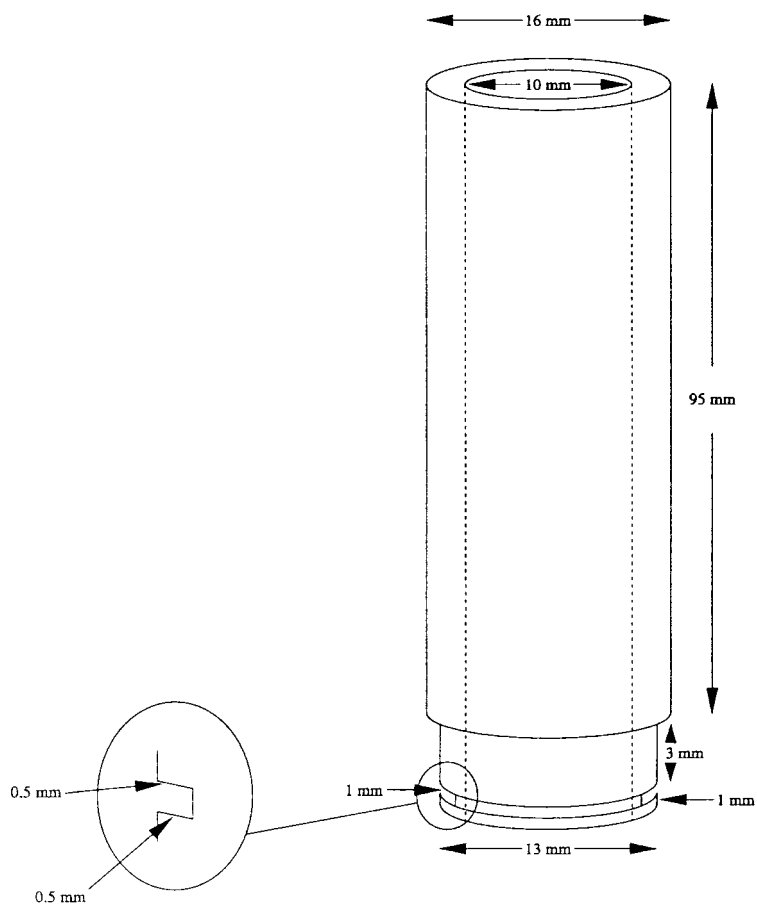
- Angivelse i tabelform af målte værdier for modstand (TER-testen) eller værdier for den procentuelle levedygtighed (test med human hudmodel) for teststoffet, positive og negative kontroller og eventuelle standardreferencestoffer, og for data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser og gennemsnitsværdier
- Beskrivelse af eventuelle andre observationer.

*Diskussion af resultater**Konklusioner***4. REFERENCER**

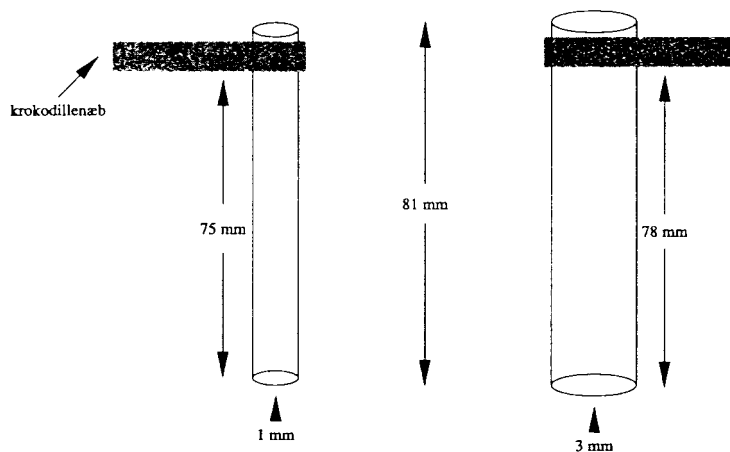
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, s. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, s. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, s. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, s. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, s. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, s. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, s. 219-255.

Figur 1

PTFE-rørs mål

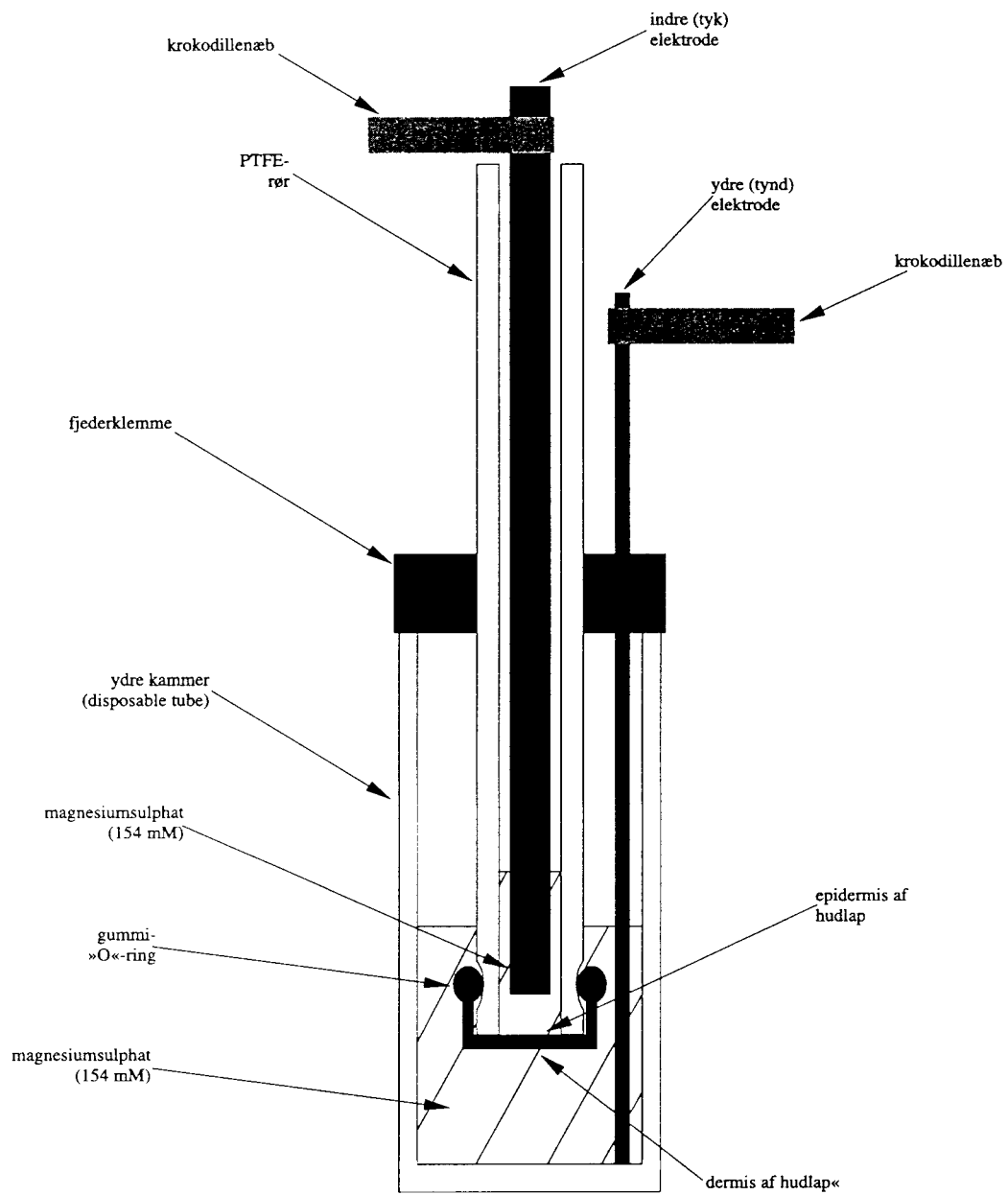


Elektroders mål



Figur 2

Apparatur til rottehud-TER-test



BILAG II

»B.41. FOTOTOKSICITET — IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Fototoksicitet defineres som det toksiske respons, der fremkaldes på huden, efter at den har været udsat for bestemte kemiske stoffer og en påfølgende eksponering for lys, eller som det respons, der fremkaldes ved bestråling af huden efter systemisk indgift af et kemisk stof.

Resultater fra in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten bruges til identifikation af et stofs fototoksiske potentiale, dvs. påvisning af eventuel risiko ved teststoffet i forbindelse med bestråling med UV-lys og synligt lys.

Eftersom påvisning af fotocytotoksicitet induceret af den kombinerede virkning af et kemisk stof og lys er det toksikologiske slutprodukt af in vitro-testen, kan den identificere stoffer, der er fototoksiske in vivo efter systemisk indgift og fordeling i huden, og stoffer, som forårsager fotoirritation efter lokal applikation på huden.

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten blev udviklet og valideret i et fælles EU/COLIPA-projekt fra 1992-1997 (1) (2) (3) med det formål at finde frem til et pålideligt in vitro-alternativ til de forskellige in vivo-test, der blev anvendt. I 1996 anbefalede en OECD-workshop at anvende in vitro-metoder til vurdering af fototoksicitet (4).

Resultater fra in vitro NRU-fototoksicitetstesten blev sammenlignet med akutte fototoksicitets-/fotoirritationsvirkninger på dyr og mennesker, og testen har vist sig fortræffelig til at forudsige disse virkninger. Testen er ikke beregnet til påvisning af andre negative virkninger af den kombinerede effekt af kemiske stoffer og lys, f.eks. fotogenotoksicitet, fotoallergi og fotocarcinogenicitet, selv om mange kemikalier med de nævnte egenskaber vil give et positivt resultat med in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten. Dertil kommer, at testen ikke er beregnet til vurdering af styrken af fototoksicitet.

En fremgangsmåde til vurdering af kemikaliers toksicitet vises trinvist i tillægget.

1.2. Definitioner

Strålingsintensitet: (irradiance) intensiteten af ultraviolet (UV) eller synligt lys som falder på en overflade, målt i W/m^2 eller mW/cm^2 .

Lydosis: mængden (= intensitet \times tid) af ultraviolet (UV) eller synlig stråling, som falder på en overflade, udtrykt i joule (= $W \times s$) pr. overfladeenhed, f.eks. J/m^2 eller J/cm^2 .

Bølgelængder for UV-lys: betegnelser anbefalet af CIE (»Den Internationale Belysningskommission«): UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) og UVC (100-280 nm). Også andre betegnelser bruges: grænsen mellem UVB og UVA placeres ofte ved 320 nm, og UVA bliver sommetider opdelt i UV-A1 og UV-A2, med en grænse ved ca. 340 nm.

Cellernes levedygtighed: parameter, der måler en cellepopulations totale aktivitet (f.eks. farvestoffet Neutral Red's optagelse i levende cellers lysosomer), som, afhængigt af målemetode og testens udformning, korrelerer med det totale antal celler og/eller deres levedygtighed.

Cellernes relative levedygtighed: cellernes levedygtighed udtrykt i forhold til negative kontroller (opløsningsmiddel), som har været gennem hele testproceduren (enten +UV eller -UV), men som ikke er behandlet med et kemisk stof.

Forsøgsmodel, der skal udsige noget om stoffers virkning: en algoritme til beregning af toksisk potentiale ud fra resultaterne af toksicitetstesten. I nærværende retningslinier kan PIF og MPE anvendes til beregning af det fototoksiske potentiale ud fra resultaterne fra in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

PIF (fotoirritationsfaktor): en faktor, beregnet ud fra sammenlignende målinger af to lige effektive (EC_{50}) cytotoxiske koncentrationer af teststoffet, ved fravær (-UV) eller tilstedeværelse (+UV) af en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

MPE (gennemsnitlig lyseffekt): en ny parameter afledt af matematisk analyse af to responskurvers totale udtrækning fremkommet ved fravær (-UV) eller tilstedeværelse (+UV) af en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

Fototoksicitet: et akut, toksisk respons, der opnås efter førstegangsausdættelse af huden for bestemte stoffer og påfølgende lyspåvirkning, eller som induceres ved bestråling af huden efter systemisk indgift af et kemisk stof.

Fotoirritation: en underafdeling af udtrykket »fototoksicitet«, som kun beskriver hudens fototoksiske reaktioner på kemikalier, administreret lokalt eller oralt. Disse fototoksiske reaktioner medfører altid uspecifikke celledskader (svarende til solskoldethed).

Fotoallergi: en erhvervet immunologisk reaktionsevne, som ikke fremkommer efter den første behandling med kemikallet og lys, men hvor hudens reaktionsevne først kan påvises efter en induktionsperiode på 1-2 uger.

Fotogenotoksicitet: et genotoksisk respons fra gener efter udsættelse af celler for en ikke-genotoksisk dosis af UV/synligt lys og et ikke-genotoksisk kemikalie.

Fotocarcinogenicitet: carcinogenicitet induceret ved gentagne applikationer af kemikalie og lys. Udtrykket »foto co-carcinogenese« anvendes, hvis UV-induceret tumordannelse forøges af et kemikalie.

1.3. Referencestoffer

Ud over som positiv kontrol at teste Chlorpromazin sideløbende hver gang, anbefales det med henblik på nyetablering af 3T3 NRU-fototoksicitetstesten som referencestoffer at anvende et udvalg af de kemikalier, der er anvendt i de ringprøverne af denne test (1) (3) (13).

1.4. Indledende betragtninger

Mange kemikalietyper er blevet rapporteret som fototoksiske (5) (6) (7) (8). Det eneste fælles træk er deres evne til at absorbere lysenergi fra sollys. Ifølge fotokemiens første lov (Grotthaus-Draper's lov) kræver en fotoreaktion tilstrækkelig absorption af lyskvanter. Før en biologisk testning udføres efter nærværende retningslinier, bør kemikaliet absorptionspektrum for UV/synligt lys fastlægges (f.eks. efter OECD Test Guideline 101). Hvis den molære ekstinktions/absorptionskoefficient er mindre end $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ har kemikallet ikke noget fotoreaktivt potentiale, og det er overflødig at undersøge det med in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten eller nogen anden biologisk test med henblik på påvisning af fotokemisk effekt (tillæg).

1.5. Testmetodens princip

Man har identificeret fire forskellige mekanismer, hvorved et (kemisk) farvelegeme ved lysabsorption kan fremkalde et fototoksisk respons (7). Alle fire medfører cellebeskadigelse. In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er derfor baseret på sammenligning af et kemisk stofs cytotoxicitet, når det ved undersøgelsen udsættes eller ikke udsættes for UVA/synligt lys i en dosis, der ikke i sig selv er cytotoxisk. Cytotoxicitet forstås i denne test som koncentrationsafhængig reduktion af optagelse af farvestoffet Neutral Red (NR (9)) 24 timer efter behandling med teststoffet og bestråling.

Balb/c 3T3-celler dyrkes i 24 timer, så der dannes et encellet lag. To mikrotiterplader med 96 brønde hver anvendes pr. teststof. Pladerne præinkuberes med 8 forskellige koncentrationer af det teststoffet i en time. En af pladerne bliver derefter udsat for ikke-cytotoxisk UVA/synligt lys i en dosis på 5 J/cm^2 UVA (+UV-eksperiment), mens den anden plade lægges mørkt (-UV-eksperiment). Derefter erstattes behandlingsmediet med dyrkningsmediet på begge plader, og efter 24 timers inkubation bestemmes cellelevedygtigheden ved den mængde af Neutral Red, der optages (NRU) i løbet af 3 timer. Den relative cellelevedygtighed, udtrykt som procent af de ubehandlede negative kontroller, beregnes for hver af de 8 testkoncentrationer. Med henblik på vurdering af den fototoksiske styrke sammenlignes det koncentrationsafhængige respons med (+UV) eller uden (-UV) bestråling, almindeligvis på EC_{50} -niveauet, dvs. ved den koncentration, som nedsætter cellelevedygtigheden med 50% i forhold til de ubehandlede kontroller.

1.6. Kvalitetskriterier

Cellernes UVA-følsomhed, historiske data: cellernes følsomhed for UVA bør kontrolleres regelmæssigt. Cellerne udsås med samme tæthed som bliver anvendt i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, bestråles den følgende dag med UVA-doser på $1-9 \text{ J/cm}^2$, og cellelevedygtigheden måles næste dag med NRU-testen. Kvalitetskravet er, at levedygtigheden efter bestråling med 5 J/cm^2 ikke er mindre end 80% af kontrollen, som var opbevaret mørkt. Ved den højeste UVA dosis på 9 J/cm^2 skal levedygtigheden ikke være mindre end 50% af den mørke kontrol. Denne kontrolundersøgelse bør gentages for ca. hver 10. cellegeneration.

UVA-følsomhed i den negative kontrol, den foreliggende test: kvalitetskravet er, at den negative kontrol (celler i Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) med eller uden 1% dimethylsulfoxid (DMSO) eller 1% ethanol (EtOH)) i +UVA-eksperimentet udviser en cellelevedygtighed, som ikke er mindre end 80% af de ikke-bestrålede celler i samme opløsning i det parallelt løbende forsøg i mørke (-UVA).

Levedygtighed i de negative kontroller: den absolutte optical density/extinction ($OD_{540 \text{ NRU}}$) målt i ekstraktet af NR fra den negative kontrol angiver om de 1×10^4 celler udsåede pr. brønd er vokset med normal fordoblings-tid i undersøgelsens to døgn. En undersøgelse accepteres, hvis den gennemsnitlige $OD_{540 \text{ NRU}}$ i de ubehandlede kontroller er $\geq 0,2$

Positiv kontrol: et kendt fototoksisk kemikalie skal testes sideløbende med hver in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Chlorpromazin (CPZ) blev anvendt som positiv kontrol i EU/COLIPA-valideringsundersøgelsen og anbefales derfor. Nedenstående kriterier blev defineret for accept af testen udført med CPZ i standardproceduren i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten: CPZ bestrålet (+UVA): $EC_{50} = 0,1$ til $2 \mu\text{g/ml}$, CPZ ikke-bestrålet (-UVA): $EC_{50} = 7,0$ til $90,0 \mu\text{g/ml}$. Fotoirritationsfaktoren (PIF), dvs. ændring af EC_{50} , bør være mindst 6.

Andre kendte fototoksiske kemikalier, der passer til teststoffets kemiske gruppe eller opløseligheds-karakteristik, kan anvendes som sideløbende positiv kontrol i stedet for CPZ. I så fald skal højeste og laveste værdier for EC_{50} og PIF eller MPE (gennemsnitlig lyseffekt) være tilstrækkeligt definerede som kriterier for accept af testen.

1.7. Beskrivelse af testmetoden

1.7.1. Forberedelser

1.7.1.1. Celler

En stabil musefibroblastcellelinje — Balb/c 3T3, klon 31 — enten fra ATCC eller fra ECACC blev brugt i valideringsundersøgelsen og anbefales derfor. Andre celler kan med held anvendes med samme testfremgangsmåde, hvis dyrkningsbetingelserne er tilpasset disse cellers særlige behov, men det er nødvendigt at bevise deres ækvivalens.

Cellerne må regelmæssigt undersøges for kontamination med mycoplasma og må kun anvendes, hvis en sådan undersøgelse falder tilfredsstillende ud.

Eftersom følsomheden for UVA har tendens til at forøges med antallet af cellegenerationer, bør Balb/c 3T3-celler med det lavest mulige antal foretrakkes, fortrinsvis mindre end 100. Det er vigtigt, at Balb/c 3T3-cellernes UVA-følsomhed kontrolleres regelmæssigt, som beskrevet under kvalitetskontrol i disse retningslinier.

1.7.1.2. Medier og dyrkningsbetingelser

Passende dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser bør anvendes til rutinedyrkning af celler og under testen. For Balb/c 3T3-cellers vedkommende er det DMEM, suppleret med 10% serum fra nyfødte kalve, 4 mM glutamin, penicillin og streptomycin og en inkubation i fugtig atmosfære ved 37°C /7,5% CO_2 . Det er specielt vigtigt, at betingelserne for dyrkning sikrer at tiden for cellecyklus er indenfor det normale for cellerne.

1.7.1.3. Fremstilling af cellekulturer

Nedfrosne celler sås i et dyrkningsmedium med en passende tæthed og subkultur anlagt mindst én gang, før de bliver anvendt i en in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest.

Til brug i fototoksicitetstesten sås cellerne ud i et dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellekulturen ikke konfluenter ved testens afslutning, dvs. når cellelevedygtigheden måles 48 timer efter udsåning af cellerne. For Balb/c 3T3-celler på en mikrotiterplade med 96 brønde er den anbefalede celletæthed 1×10^4 pr. brønd.

For hvert teststof udsås celler på samme måde i to forskellige mikrotiterplader med 96 brønde, og de føres sideløbende igennem hele testproceduren under identiske dyrkningsbetingelser, bortset fra den tid, hvor den ene plade bestråles (+UVA/synligt lys) og den anden anbringes i mørke (-UVA/synligt lys).

1.7.1.4. Metabolisk aktivering

Medens det for alle in vitro-test til påvisning af genotoksisk og carcinogenotoksisk potentiale er nødvendigt at anvende et stofskifteaktiverende system, kendes der, for så vidt angår fototoksicitet, endnu ikke noget kemikalie, der kræver et sådant stofskifteaktiverende system for at kunne fungere som et fototoksin in vivo eller in vitro. Det er således ikke i nærværende test hverken nødvendigt eller videnskabeligt berettiget at anvende et stofskifteaktiverende system.

1.7.1.5. Teststof/fremstilling

Teststoffer skal være frisk fremstillede lige før brugen, medmindre data for deres stabilitet påviser, at opbevaring kan accepteres. Fremstilling under rødt lys kan være nødvendigt, dersom hurtig fotodegradation kan finde sted.

Teststofferne bør opløses i saltvand med stødpudevirkning, f.eks. Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) eller fysiologisk saltvand med fosfatstødpude (PBS), som, for at undgå interferens under bestrålingen, ikke må indeholde proteinkomponenter eller lysabsorberende pH-indikatorer.

Testkemikalier med begrænset opløselighed i vand bør opløses i passende opløsningsmiddel i 100 gange den ønskede slutkoncentration og derefter fortyndes 1:100 med stødpude-saltopløsning. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, skal det forefindes i et konstant volumen på 1% (v/v) i alle kulturer, dvs. i de negative kontroller såvel som i alle fortyndinger af teststoffet.

Dimethylsulphoxid (DMSO) og ethanol (EtOH) anbefales som opløsningsmidler. Andre opløsningsmidler med lav cytotoxicitet (f.eks. acetone) kan være passende, men de skal omhyggeligt undersøges for særlige egenskaber, f.eks. reaktion med teststoffet, quenching af den fototoksiske effekt, evnen til at opfange radikaler.

Vortexblanding og/eller ultralydbehandling og/eller opvarmning til 37°C kan anvendes for at øge opløsningsprocessen.

1.7.1.6. UV-bestråling/fremstilling

Lyskilde: valget af en passende lyskilde med passende filter er den mest afgørende faktor i testning for fototoksicitet. UVA og synligt lys ledsages almindeligvis af fotosensibilisering (7) (10), mens UVB er mindre relevant og direkte stærkt cytotoxisk i stigende grad op til 1000 gange fra 313 til 280 nm (11). Som kriterium for valg af den rigtige lyskilde er det vigtigt, at lyskilden udsender bølgelængder, som absorberes af teststoffet, og at lysdosis (opnået indenfor en rimelig tid) er tilstrækkelig til påvisning af stoffer, der er kendt for fotosensibilisering. Yderligere bør de anvendte bølgelængder og doser, inklusive varmepåvirkning (infrarødt lys), ikke være unødigt skadelige for testsystemet.

Lamper med kunstigt sollys regnes for den optimale lyskilde. Lys fra både xenon- og (doteret) kviksølvmetalhalidlysbuer bruges. Sidstnævnte har den fordel, at den udsender mindre varme og er billigere, men den matcher ikke sollyset perfekt. Eftersom alle kunstige sollyskilder udsender betydelige mængder UVB, bør de forsynes med passende filtre for at svække de meget toksiske UVB-bølgelængder.

Til in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten bør et bestrålingsspektrum praktisk taget uden UVB anvendes (UVA:UVB ~ 1:20). Et eksempel på den spektrale strålingsfordeling fra det i valideringsundersøgelsen af in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten anvendte kunstige sollys er offentliggjort (3).

Dosimetri: strålingsintensiteten (irradiance) skal regelmæssigt checkes før hver test for fototoksicitet, ved hjælp af et passende bredbåndet UV-meter. UV-meteret skal være kalibreret til lyskilden. Dets funktionsevne skal checkes, til hvilket formål brugen af et reference UV-meter af samme type og identisk kalibrering anbefales. Ideelt er det med større intervaller at bruge et spektrometer for at måle den spektrale strålingsintensitet fra den med filter forsynede lyskilde og for at checke kalibreringen af det bredbandede UV-meter, men til anvendelse af sådant apparatur kræves passende uddannet personale.

En dosis på 5 J/cm² UVA blev i valideringsundersøgelsen fastlagt som værende uden cytotoxisk effekt på Balb/c 3T3-celler og tilstrækkeligt kraftig til at aktivere selv svagt fototoksiske kemikalier. For at opnå 5 J/cm² inden for en periode på 50 minutter skal strålingsintensiteten sættes til 1,666 mW/cm². Hvis man anvender andre celler eller en anden lyskilde, skal UVA-dosis rettes til, så den ikke er skadelig for cellerne, men tilstrækkelig til at påvise standardfototoksiner. Lyseksposteringsiden beregnes på følgende måde:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{lysdosis (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{strålingsintensitet (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2. Testbetingelser

Højeste koncentration af et teststof bør ikke overskride 100 µl/ml, idet alle fototoksiske kemikalier er fundet ved brug af lavere koncentrationer, medens højere koncentrationer har tendens til at give falsk positive resultater (13). PH i opløsningen med den højeste koncentration af teststoffet bør for at være rimelig ligge mellem 6,5 og 7,8.

De forskellige koncentrationer af et teststof med (+UVA) eller uden (-UVA) lys bør fastlægges i et forudgående forsøg. Koncentrationerne, deres intervaller og deres højeste og laveste grænse skal justeres sådan, at koncentration/respons-kurverne er tilstrækkeligt underbygget af de eksperimentelle data. Geometrisk fortyndingsrække (med en konstant fortyndingsfaktor) bør anvendes.

1.7.3. Fremgangsmåde ⁽¹⁾

1.7.3.1. 1. dag

Der fremstilles en suspension af 1×10^5 celler/ml i et kulturmedium. 100 µl af det rene kulturmedium afpipetteres i de perifere brønde i en mikrotiterplade med 96 brønde til vævskultur, disse udgør de negative kontroller. I de resterende brønde afpipetteres 100 µl af celsuspensionen med 1×10^5 celler/ml (= 1×10^4 celler/brønd). Der fremstilles 2 plader pr. teststof, den ene til bestemmelse af cytotoxicitet (-UVA) og den anden til bestemmelse af fototoxicitet (+UVA).

Cellerne inkuberes i 24 timer (37°C /7,5% CO_2), indtil der har dannet sig et halvt sammenflydende enkeltlag. Denne inkubationsperiode giver cellerne mulighed for at regenerere og vedhæfte sig samt for eksponentiel vækst.

1.7.3.2. 2. dag

Efter inkubationen dekanteres kulturmediet fra cellerne, og der vaskes to gange med 150 µl EBSS/PBS pr. brønd. Der tilsættes 100 µl EBSS/PBS indeholdende den passende koncentration af teststoffet eller kun 100 µl opløsningsmiddel (negativ kontrol). Der anvendes 8 forskellige koncentrationer af teststoffet. Cellerne inkuberes med teststoffet i mørke i 60 minutter (37°C /7,5% CO_2).

Under +UVA-forsøget bestråles cellerne ved stuetemperatur i 50 minutter gennem låget på mikrotiterpladen med $1,7 \text{ mW/cm}^2$ UVA (= 5 J/cm^2). Med en elektrisk vifte hindres dannelse af kondensvand under låget. Den tilsvarende -UVA-plade opbevares i mørke ved stuetemperatur ligeledes i 50 minutter.

Testopløsningen dekanteres, vaskes to gange med 150 µl EBSS/PBS. Kulturmediet erstattes med EBSS/PBS og inkuberes (37°C /7,5% CO_2) til næste dag (18-22 timer).

1.7.3.3. 3. dag

Mikroskopisk evaluering

Cellerne undersøges i mikroskop med fasekontrast. Forandringer i cellernes morfologi, som skyldes cytotoxiske virkninger fra teststoffet, noteres. Dette check anbefales for at udelukke fejl i forsøget, men noterne bruges ikke til evaluering af cytotoxicitet eller fototoxicitet.

Neutral Red's optagelse i cellerne

Cellerne vaskes med 150 µl forvarmet EBSS/PBS. Vaskeopløsning fjernes ved at banke let på pladen. 100 µl Neutral Red-opløsning tilsættes, inkuberes i fugtig atmosfære ved 37°C og 7,5% CO_2 i 3 timer.

Efter inkubationen fjernes Neutral Red-opløsningen, og cellerne vaskes med 150 µl EBSS/PBS. Der dekanteres og trykkes efter med sugende papir, så alt EBSS/PBS fjernes. (Eventuelt: pladen centrifugeres, så væsken slynges bort).

Der tilsættes nøjagtig 150 µl opløsning af frisk fremstillet ethanol/eddikesyre, som ekstraherer Neutral Red.

Mikrotiterpladen rystes hurtigt på en dertil beregnet shaker i 10 minutter, indtil al Neutral Red er fjernet fra cellerne og har dannet en homogen opløsning.

OD af Neutral Red-ekstraktet måles ved 540 nm i et spektrofotometer, med de negative kontroller som reference. Resultaterne opbevares i et passende filformat (f.eks. ASCII) med henblik på senere analyse.

⁽¹⁾ Yderligere detaljer findes i reference (12).

2. DATA

2.1. Kvalitative og kvantitative data

Resultaterne af undersøgelsen skal give mulighed for en analyse af koncentration/respons fremkommet med og uden bestråling af UVA/synligt lys. Hvis der påvises cytotoxicitet, skal man anføre højeste og laveste undersøgte koncentration, og de forskellige koncentrationer, der er anvendt, skal tilsammen indtegnes på en kurve over tallene. Da et teststof i mørke (-UVA) kan være uden cytotoxisk effekt i koncentrationer op til de 100 µg/ml, som er sat som grænse, men stærkt cytotoxisk, når det bliver bestrålet (+UVA), kan det være nødvendigt at undersøge det pågældende stof i forskellige fortyndingsrækker i de to systemer. Hvis der ikke påvises cytotoxicitet, hverken med UVA/synligt lys eller uden UVA/synligt lys, behøver man ikke anvende så mange forskellige koncentrationer i undersøgelsen.

Et klart positivt resultat kræver ikke bekræftelse i en ny undersøgelse, og det samme gælder klart negative resultater, hvis stoffet er undersøgt i tilstrækkeligt høje koncentrationer. I disse tilfælde er det tilstrækkeligt med ét forsøg, hvis der forud herfor er gennemført et eller flere forberedende forsøg, med henblik på at finde de rette koncentrationer.

Usikre resultater, der ligger nær grænseværdien, skal kontrolleres ved at gentage undersøgelsen.

Hvis det er nødvendigt at gentage en undersøgelse, kan det være påkrævet at variere forsøgsbetingelserne for at opnå et klart resultat. Af central betydning i denne sammenhæng er fremstilling af flere opløsninger med teststoffet. En ændring heri (co-solvens, blanding, ultralydbehandling) kan være særdeles relevant ved gentagelsen af en undersøgelse. Alternativt kan en ændring i inkubationstiden før bestråling overvejes. En kortere tid kan være relevant for stoffer, der er ustabile i vandig opløsning.

2.2. Behandling af resultaterne

Hvor det er muligt, fastlægges den koncentration af teststoffet, der giver en 50% hæmning af celle-NRU (EC₅₀). Dette kan gøres ved anvendelse af passende ikke-lineær regression (fortrinsvis en Hill-funktion eller logistisk regression) på koncentration/respons-data eller andre passende procedurer (14). Før EC₅₀ anvendes til videre beregninger, skal beregningerne checkes. Alternativt kan beregningen af EC₅₀ foretages grafisk. Det anbefales at anvende sandsynlighedspapir (x-akse: log, y-akse: probit), da koncentration/respons-funktionen ofte vil være næsten lineær efter denne transformation.

2.3. Evaluering af resultaterne (forsøgsmodeller, der skal forudsige noget om stoffers virkning)

2.3.1. Forsøgsmodel 1, der skal forudsige noget om fotoirritationsfaktoren (PIF)

Hvis der opnås komplette koncentration/respons-kurver både med lys (+UVA) og uden (-UVA) lys, kan fotoirritationsfaktoren (PIF) beregnes efter følgende formel:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

PIF < 5 peger ikke på noget fototoksisk potentiale, mens PIF ≥ 5 pege på fototoksisk potentiale.

Hvis et kemikalie kun er cytotoxisk +UVA, men ikke ved undersøgelsen -UVA, kan PIF ikke beregnes, selv om resultatet peger på et fototoksisk potentiale. I sådanne tilfælde kan »> PIF« beregnes, hvis (-UV)-cytotoxicitetstesten udføres til og med den højeste testkoncentration (C_{max}), og denne værdi anvendes til beregningen af »> PIF«:

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Hvis målingerne kun viser »> PIF«, peger enhver værdi > 1 på et fototoksisk potentiale.

Hvis hverken EC₅₀ (-UV) og EC₅₀ (+UV) kan beregnes, fordi kemikaliet selv ikke i den højeste testkoncentration udviser cytotoxicitet, er der ikke tale om et fototoksisk potentiale. I sådanne tilfælde anvendes et formelt »PIF = *1« til at karakterisere resultatet.

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Hvis målingerne kun viser »PIF = *1«, peges der ikke på noget fototoksisk potentiale.

I tilfældene (b) og (c) skal koncentrationerne fundet i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten nøje tages i betragtning, når der peges på et fototoksisk potentiale.

2.3.2. Forsøgsmodel 2, der skal udsige noget om den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)

Alternativt kan anvendes en ny model til påvisning af fototoksisk potentiale. Den er blevet udviklet ud fra data opnået under EU/COLIPA-valideringsundersøgelsen (15) og blindtestet i en påfølgende in vitro-undersøgelse af UV-filterkemikaliers fototoksicitet (13). Denne model kommer uden om PIF-modellens begrænsninger i de tilfælde, hvor EC_{50} ikke kan findes. Modellen anvender den gennemsnitlige lyseffekt (MPE), et mål, som er baseret på en sammenligning af komplette koncentration/respons-kurver. Humboldt Universitetet i Berlin har udviklet et computerprogram til MPE-modellen, som kan fås gratis.

2.4. Tolkning af resultaterne

Et positivt resultat i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten ($PIF \geq 5$ eller $MPE \geq 0,1$) viser, at teststoffet er fototoksisk. Hvis et sådant resultat er opnået ved koncentrationer under $10 \mu\text{g/ml}$, er det sandsynligt, at teststoffet også in vivo er fototoksisk ved lyspåvirkning. Hvis et positivt resultat kun er opnået ved den højeste testkoncentration på $100 \mu\text{g/ml}$, kan det være nødvendigt med yderligere overvejelser over stoffets risikoegenskaber eller fototoksicitet. Disse overvejelser kan gå på data vedrørende penetration, absorption og mulig akkumulation af stoffet i huden eller på brugen af en alternativ test, f.eks. en in vitro-hudtest med human hud, med henblik på af- eller bekræftelse af stoffets risikoegenskaber.

Et negativt resultat i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten ($PIF > 5$ eller $MPE < 0,1$) viser at teststoffet ikke er fototoksisk over for pattedyrceller dyrket på den beskrevne måde. I de tilfælde, hvor stoffet viser negative resultater helt op til den højeste koncentration på $100 \mu\text{g/ml}$, betyder et negativt resultat, at stoffet ikke er fototoksisk, og at fototoksicitet in vivo er usandsynlig. Konklusionen vil være den samme, hvis der fremkommer identiske koncentrationstoksicitetsvar (EC_{50}^{+UV} og EC_{50}^{-UV}) ved lavere koncentrationer. Hvis der derimod ikke påvises toksicitet (+UV og -UV), og hvis opløseligheden i vand har begrænset den mulige koncentration til værdier under $100 \mu\text{g/ml}$, kan man betvivle testens egnethed til det pågældende stof, og bekræftende undersøgelser må tages i betragtning (f.eks. en in vitro-hudmodel eller en ex vivo-hudmodel eller en in vivo-test).

3. RAPPORTERING

Testrapport

Testrapporten skal indeholde følgende information:

Teststoffet:

- Identifikationsdata og CAS-nummer, hvis kendt
- Fysiske egenskaber og renhedsgrad
- Fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen
- Stabilitet og fotostabilitet, hvis kendt

Opløsningsmiddel:

- Begrundelse for valg af opløsningsmiddel
- Teststoffets opløselighed i opløsningsmidlet
- Mængden (i procent) af opløsningsmiddel i kulturmediet (EBSS eller PBS)

Celler:

- Celletype og oprindelse
- Fravær af mycoplasma
- Antal generationer, hvis kendt
- Cellernes følsomhed for UVA, målt med det strålingsudstyr, som anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten

Testbetingelser (a); inkubation før og efter udsættelsen for kemikaliet:

- Type og sammensætning af dyrkningsmediet
- Omstændigheder ved inkubationen (CO_2 -koncentration, temperatur, fugtighed)
- Varighed af inkubationen (før og efter udsættelsen for kemikaliet)

Testbetingelser (b); udsættelsen for kemikaliet

- Begrundelse for valg af koncentrationer af teststoffet både med og uden bestråling med UV/synligt lys
- Begrundelse for den største koncentration anvendt ved undersøgelsen, dersom stoffet er tungtopløseligt, og cytotoxicitet ikke er påvist
- Type og sammensætning af behandlingsmediet (stødpude-salt-opløsningen)
- Varigheden af udsættelsen for det kemiske stof

Testbetingelser (c); bestråling

- Begrundelse for valget af lyskilde
- Lyskildens spektrale strålingskarakteristik
- Det (de) anvendte filterfiltres transmission/absorptions-karakteristik
- Det anvendte spektrometers karakteristik og detaljeret beskrivelse af dets kalibrering
- Afstanden mellem lyskilden og testsystemet
- UVA-strålingsintensiteten (irradiance) for den pågældende afstand udtrykt i mW/cm^2
- Varigheden af udsættelsen for UV/synligt lys
- UVA-dosis (strålingsintensitet \times tid) udtrykt i J/cm^2
- Temperaturen i cellekulturen under bestrålingen og den tilsvarende cellekultur samtidigt opbevaret i mørke

Testbetingelser (d); NRU-testen

- Sammensætning af Neutral Red-mediet
- Varigheden af inkubationen med NR
- Omstændigheder ved inkubationen (CO_2 -koncentration, temperatur, fugtighed)
- Omstændighederne ved ekstraktion af NR (ekstraktionsmiddel, varighed)
- Bølgelængde anvendt ved den spektrofotometriske aflæsning af OD (ekstinktionen) for NR
- Angivelse af eventuel referencebølgelængde
- Indholdet i brønden anvendt til eventuel måling af negative kontroller

Resultater

- Cellelevedygtighed for hver koncentration af teststoffet udtrykt som procent af levedygtigheden i kontrollerne
- Koncentration/respons-kurver (koncentration af teststoffet over for den relative cellelevedygtighed), fremkommet i samhörende eksperimenter, +UVA og -UVA
- Analyse af data af kurverne over koncentration/respons; hvis muligt beregning/kalkulation af EC_{50} (+UVA) og EC_{50} (-UVA)
- Sammenligning af de to koncentration/respons-kurver, som er fremkommet ved bestråling med og uden UVA/synligt lys, enten ved beregning af fotoirritationsfaktor (PIF), eller beregning af den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)
- Klassifikation af fototoxiciteten
- Kriterier for accept af test (a), samtidig negativ kontrol:
 - Absolut levedygtighed (ekstinktion (OD) for NR-ekstraktet) for bestrålede og ikke-bestrålede celler
 - Forklarende data for den negative kontrol, gennemsnit og standarddeviation
- Kriterier for accept af test (b), samtidig positiv kontrol:
 - EC_{50} (+UVA) og EC_{50} (-UVA) og PIF for den positive kontrols kemikalie
 - forklarende data for den positive kontrols kemikalie: EC_{50} (+UVA) og EC_{50} (-UVA) og PIF, gennemsnit og standarddeviation

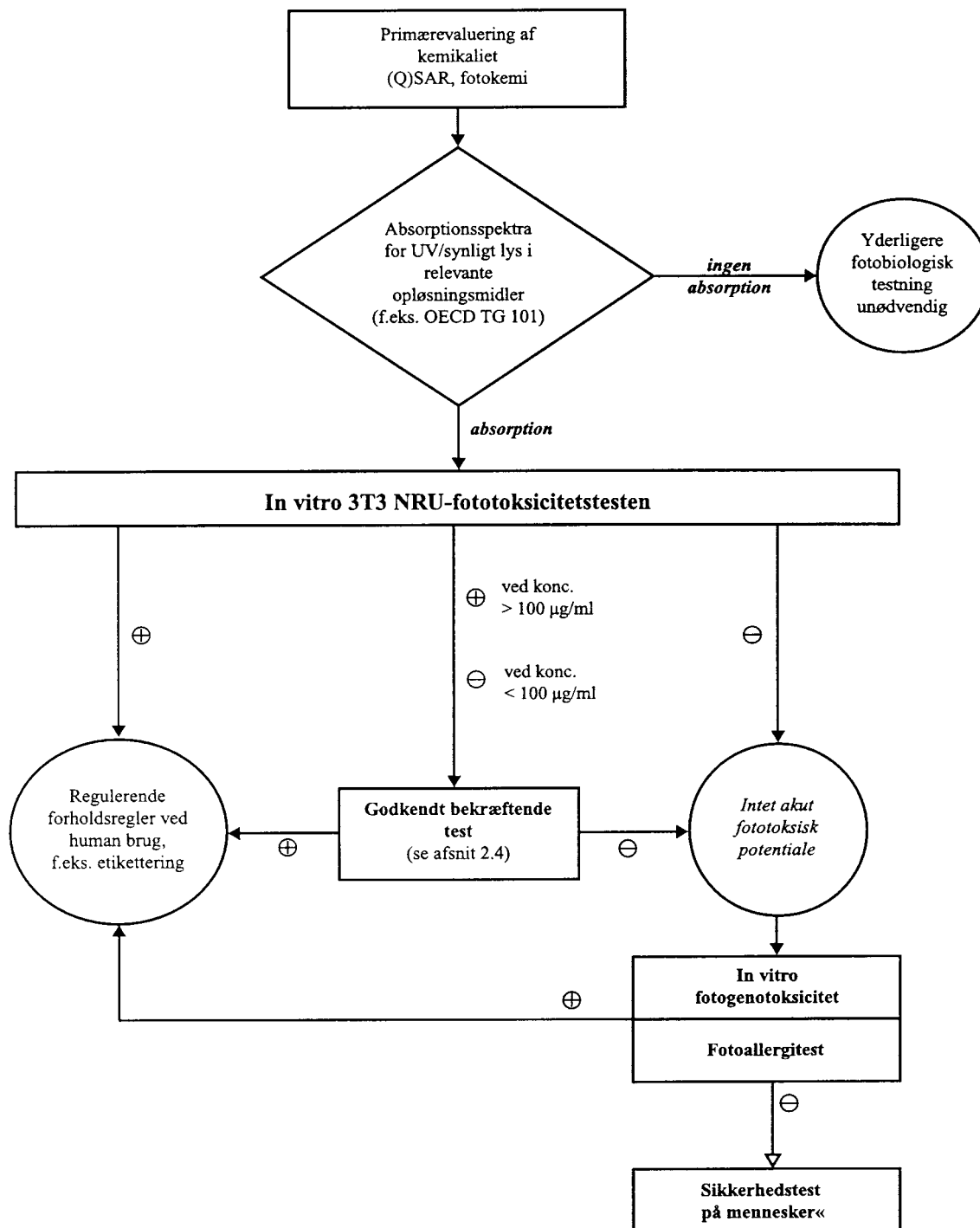
*Diskussion af resultater**Konklusioner*

4. REFERENCER

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, s. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA 26, s. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA »*In vitro* phototoxicity« validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, s. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, s. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, s. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, ATLA 22, s. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, s. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, s. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, s. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, s. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project »*In Vitro* Photoirritation«.
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, ATLA 26, s. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, s. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, ATLA 25, s. 445-462.

Tillæg

3T3 NRU-fototoksicitetstestens rolle i et sekvensskema til testning af kemikaliers fototoksicitet



II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 19. maj 2000

om berigtigelse af direktiv 98/98/EF om femogtyvende tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer

(meddelt under nummer K(2000) 1333)

(EØS-relevant tekst)

(2000/368/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer⁽¹⁾, senest ændret ved Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/33/EF⁽²⁾, særlig artikel 28, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Bilag VI til direktiv 67/548/EØF indeholder kriterier for klassificering og etikettering af farlige stoffer og præparater; bilag VI blev senest ændret ved bilag 4 til direktiv 98/98/EF⁽³⁾; punkt 3.2.3, 3.2.8, 6.2 og 8 i bilag 4 til direktiv 98/98/EF er mangelfulde; det er derfor nødvendigt at ændre bilag 4 til direktiv 98/98/EF.

(2) De i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Udvalget for Tilpasning

til den Tekniske Udvikling af Direktiverne om Fjernelse af Tekniske Hindringer for Handelen med Farlige Stoffer og Præparater —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Bilag 4 til direktiv 98/98/EF erstattes med bilaget til denne beslutning.

Artikel 2

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 19. maj 2000.

På Kommissionens vegne

Margot WALLSTRÖM

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT 196 af 16.8.1967, s. 1.

⁽²⁾ EFT L 199 af 30.7.1999, s. 57.

⁽³⁾ EFT L 355 af 30.12.1998, s. 1.

BILAG

»BILAG 4

- 1.6. For stoffer kan de data, som er nødvendige for klassificering og etikettering, fremskaffes således:
- a) For de stoffer, for hvilke oplysningerne i bilag VII kræves, findes de fleste nødvendige data til klassificering og etikettering i »basissættet«. Denne klassificering og etikettering skal revideres, når der fremkommer flere oplysninger (bilag VIII).
 - b) For andre stoffer (f.eks. dem, som er omtalt i ovenstående punkt 1.5) må de data, som er nødvendige for klassificering og etikettering, fremskaffes fra forskellige kilder — f.eks.: resultater fra tidligere undersøgelser, oplysninger, som kræves i medfør af internationale regler for transport af farligt gods, oplysninger fra opslagsværker og fra litteraturen eller oplysninger stammende fra praktiske erfaringer. Hvor det er relevant, kan der også tages hensyn til resultaterne af struktur/aktivitet-relationer og ekspertvurderinger.

For præparater kan de data, som er nødvendige for klassificering og etikettering, fremskaffes således:

- a) Hvis det drejer sig om fysisk-kemiske data: ved anvendelse af de metoder, der er anført i bilag V. For gasformige præparater kan der anvendes en beregningsmetode for antændelige og oxiderende egenskaber (jf. kapitel 9).
- b) Hvis det drejer sig om data vedrørende virkninger for sundheden:
 - ved anvendelse af de metoder, der er anført i bilag V, og/eller ved anvendelse af den konventionelle metode, der er henvist til artikel 3, stk. 5, litra a) til i), i direktiv 88/379/EØF, eller, for så vidt angår R 65, ved anvendelse af reglerne i punkt 3.2.3
 - hvis det imidlertid drejer sig om evaluering af kræftfremkaldende, mutagene eller reproduktionstoksiske virkninger: ved anvendelse af den konventionelle metode, der er henvist til i artikel 3, stk. 5, litra j) til q), i direktiv 88/379/EØF.

Note vedrørende udførelse af dyreforsøg

Udførelsen af dyreforsøg til opnåelse af forsøgsdata er omfattet af bestemmelserne i direktiv 86/609/EØF om beskyttelse af dyr, der anvendes til forsøg.

1.7.2. *Anvendelse af kriterier for stoffer*

Kriterierne i dette bilag finder direkte anvendelse, når de pågældende data er opnået ved undersøgelsesmetoder, som svarer til dem, der er beskrevet i bilag V. I andre tilfælde må de foreliggende data evalueres ved at sammenligne de anvendte undersøgelsesmetoder med dem, der er anført i bilag V, og de regler, der er anført i dette bilag, med henblik på bestemmelse af den rigtige klassificering og etikettering.

I nogle tilfælde kan der være tvivl om, hvorledes de pågældende kriterier skal anvendes, navnlig når de kræver anvendelse af ekspertvurdering. I sådanne tilfælde skal fabrikanten, forhandleren eller importøren klassificere og etikettere stoffet midlertidigt på grundlag af en kompetent persons vurdering af dokumentationen.

Hvor ovennævnte procedure er blevet fulgt, men der er frygt for eventuel inkonsekvens, kan der fremsættes et forslag med henblik på at indføre den midlertidige klassificering i bilag I, jf. dog artikel 6. Forslaget skal fremsættes til en medlemsstat og skal ledsages af relevante videnskabelige data (se også punkt 4.1).

En lignende procedure kan følges, når der foreligger oplysninger, som kan give tvivl om nøjagtigheden af en eksisterende anførsel i bilag I.

2.2.2.1. *Bemærkninger vedrørende peroxider*

Hvad de eksplosive egenskaber angår klassificeres organiske peroxider eller præparater med indhold heraf i den form, hvori de markedsføres, efter kriterierne i punkt 2.2.1 på grundlag af prøver, som gennemføres efter metoderne i bilag V.

I forbindelse med de brandnærende egenskaber kan de eksisterende metoder i bilag V ikke anvendes på organiske peroxider.

Hvad stoffer angår klassificeres organiske peroxider, der ikke allerede klassificeres som eksplosive, som farlige på grundlag af deres struktur (f.eks. R-O-O-H; R₁-O-O-R₂).

Præparater, der ikke allerede klassificeres som eksplosive, klassificeres under anvendelse af den beregningsmetode, der er baseret på det procentvise indhold af aktivt ilt, og som er vist i punkt 9.5.

Organiske peroxider eller præparater med indhold heraf, der ikke allerede klassificeres som eksplosive, klassificeres som brandnærende, såfremt peroxidet eller præparatet indeholder:

- over 5 % organiske peroxider, eller
- over 0,5 % aktivt ilt fra de organiske peroxider og over 5 % hydrogenperoxid.

3.2.3. Sundhedsskadelig

Stoffer og præparater skal klassificeres som sundhedsskadelige og foreskrives symbolet »Xn« og farebetegnelse »sundhedsskadelig« i overensstemmelse med de kriterier, som er specificeret nedenfor. Risikosætninger foreskrives i overensstemmelse med følgende kriterier:

R 22 Farlig ved indtagelse

Akut toksicitet:

- LD₅₀ oral, rotte, 200 < LD₅₀ ≤ 2 000 mg/kg
- kritisk dosis, oral, rotte, 50 mg/kg: 100 % overlevelse, men tydelige tegn på toksicitet
- mindre end 100 % overlevelse ved 500 mg/kg oral, rotte efter fastdosismetoden, se evalueringsskemaet i testmetode B1a i bilag V.

R 21 Farlig ved hudkontakt

Akut toksicitet:

- LD₅₀ dermal, rotte eller kanin: 400 < LD₅₀ ≤ 2 000 mg/kg.

R 20 Farlig ved indånding

Akut toksicitet:

- LC₅₀ indånding, rotte, for aerosoler eller partikler: 1 < LC₅₀ ≤ 5 mg/l/4 h
- LC₅₀ indånding, rotte, for gasser og dampe: 2 < LC₅₀ ≤ 20 mg/l/4 h.

R 65 Farlig: kan give lungeskade ved indtagelse

Flydende stoffer og præparater, som på grund af deres lave viskositet udgør en aspirationsfare hos mennesker:

- a) Stoffer og præparater, som indeholder alifatiske, alicykliske og aromatiske carbonhydrider i en samlet koncentration på 10 % eller derover, og som enten har:
 - en udløbstid på mindre end 30 sek. i et 3 mm ISO-bæger i overensstemmelse med ISO 2431, eller
 - en kinematisk viskositet, målt ved et kalibreret glaskapillarviskosimeter i overensstemmelse med ISO 3104/3105, på mindre end 7×10^{-6} m²/sek. 40 °C, eller
 - en kinematisk viskositet, beregnet på grundlag af målinger ved hjælp af rotationsviskosimetri i overensstemmelse med ISO 3129, på mindre end 7×10^{-6} m²/sek. ved 40 °C.

Bemærk: Klassificering af stoffer og præparater, som opfylder disse kriterier, kan undlades, såfremt deres gennemsnitlige overfladespænding er over 33 mN/m ved 25 °C målt ved Nuoy-tensiometer eller ved de målemetoder, der er vist i bilag V, del A.5.

- b) Andre stoffer og præparater, hvis der foreligger praktisk erfaring fra mennesker.

R 40 Mulighed for varig skade på helbred

- Stor sandsynlighed for, at der ud over de i kapitel 4 omhandlede virkninger forårsages irreversibel skade ved en enkelt påvirkning på en given måde, generelt med doser af ovennævnte størrelsesorden.

For at angive indgivelse/påvirkningsmåde skal en af følgende kombinationer anvendes: R 40/20, R 40/21, R 40/22, R 40/20/21, R 40/20/22, R 40/21/22, R 40/20/21/22.

R 48 Alvorlig sundhedsfare ved længere tids påvirkning

- Sandsynlighed for, at der ved gentagen eller vedvarende påvirkning ved en given applikationsmåde kan forårsages alvorlig skade (tydelig funktionsforstyrrelse eller morfologisk ændring af toksikologisk betydning).

Stoffer og præparater klassificeres mindst som sundhedsskadelige, når disse virkninger observeres ved niveauer af følgende størrelsesorden:

- oral, rotte ≤ 50 mg/kg (legemsvægt)/dag
- dermal, rotte eller kanin ≤ 100 mg/kg (legemsvægt)/dag
- indånding, rotte $\leq 0,25$ mg/l, 6 h/dag.

Disse vejledende værdier kan anvendes umiddelbart, når der i forsøg vedrørende subkronisk toksicitet (90 dage) er iagttaget alvorlige skader. Ved fortolkning af resultaterne af forsøg vedrørende subakut (28 dage) toksicitet bør disse værdier være ca. tre gange så store. Hvis der foreligger et forsøg vedrørende kronisk toksicitet (to år), bør der foretages en evaluering fra sag til sag. Hvis der foreligger resultater af undersøgelser af forskellig varighed, bør resultaterne fra undersøgelsen af den længste varighed normalt anvendes.

For at angive indgivelse/påvirkningsmåde skal en af følgende kombinationer anvendes: R 48/20, R 48/21, R 48/22, R 48/20/21, R 48/20/22, R 48/21/22, R 48/20/21/22.

3.2.3.1. Bemærkninger vedrørende flygtige stoffer

Ved bestemte stoffer, for hvilke det gælder, at koncentrationen af de mættede dampe er høj, kan der foreligge tegn på virkninger, som giver anledning til bekymring. Sådanne stoffer bliver muligvis ikke klassificeret efter kriterierne for virkninger for sundheden i dette bilag (punkt 3.2.3) eller er ikke omfattet af punkt 3.2.8. Hvor der imidlertid er tilstrækkeligt bevis for, at sådanne stoffer kan give anledning til risici under normal håndtering og brug, kan det efter individuel evaluering blive nødvendigt at klassificere dem i bilag I.

3.2.6.1. Inflammation af huden:

Følgende risikosætninger foreskrives efter de givne kriterier:

R 38 Irriterer huden

- Stoffer og præparater, som forårsager betydelig inflammation af huden, som efter en indvirkningstid på højst fire timer vedvarer mindst 24 timer, bestemt på kaniner i overensstemmelse med den i bilag V omhandlede hudirritationsprøve.

Inflammationen er betydelig

- a) hvis middelværdien af de værdier, der er opnået for enten rødme- eller skorpedannelse eller væskeansamling, beregnet for alle prøvede dyr, er 2 eller derover, eller
- b) såfremt den i bilag V omhandlede prøve er gennemført på tre dyr, hvis værdien for enten rødme- eller skorpedannelse eller væskeansamling, beregnet for hvert dyr, hos to eller flere dyr svarer til 2 eller derover.

I begge tilfælde indgår alle de på hvert aflæsningstidspunkt (24, 48 og 72 timer) opnåede værdier i beregningen af de respektive middelværdier.

Inflammation af huden er også betydelig, hvis den vedvarer på mindst to dyr indtil observationsperiodens afslutning. Der skal tages hensyn til særlige virkninger som f.eks. hævelser, skæl, misfarvning, revner, skorper og hårfældning.

Der kan også hentes relevante data fra ikke-akutte dyreforsøg (se bemærkninger til R 48, punkt 2, litra d)). Disse anses for at være signifikante, hvis de synlige virkninger svarer til de ovenfor beskrevne.

- Stoffer og præparater, som forårsager betydelig inflammation af huden, på grundlag af praktiske observationer hos mennesker, ved øjeblikkelig, længere eller gentagen kontakt.
- Organiske peroxider, medmindre der foreligger dokumentation for det modsatte.

Paræstesi: Paræstesi, som opstår hos mennesker ved hudkontakt med pyrethroidpesticider, betragtes ikke som en irriterende virkning, der begrundes klassificering som Xi; R 38. S-sætning S 24 bør imidlertid anvendes for stoffer, der kan fremkalde denne virkning.

3.2.8. Andre toksikologiske egenskaber

Supplerende risikosætninger foreskrives efter følgende kriterier (som er baseret på erfaringer, som er høstet under udarbejdelsen af bilag I) for stoffer og præparater, som er klassificeret i henhold til ovenstående punkt 2.2.1 til 3.2.7 og/eller kapitel 4 og 5.

R 29 Udvikler giftig gas ved kontakt med vand

For stoffer og præparater, der i kontakt med vand eller fugtig luft udvikler meget giftige/giftige gasarter i potentielt farlige mængder, f.eks. aluminiumphosphid, phosphorpentasulphid.

R 31 Udvikler giftig gas ved kontakt med syre

For stoffer og præparater, der reagerer med syre under udvikling af giftige gasarter i farlige mængder, f.eks. natriumhypochlorit, bariumpolysulphider. For stoffer til almindelig brug bør S 50 (Må ikke blandes med ... (angives af fabrikanten)) foretrækkes.

R 32 Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre

For stoffer og præparater, der reagerer med syre under udvikling af meget giftige gasarter i farlige mængder, f.eks. salte af hydrogencyanid, natriumazid. For stoffer til almindelig brug bør S 50 (Må ikke blandes med ... (angives af fabrikanten)) foretrækkes.

R 33 Kan ophobes i kroppen efter gentagen brug

For stoffer og præparater, som formodentlig ophobes i det menneskelige legeme, og hvor denne ophobning kan give anledning til betænkelighed, men dog ikke i så høj grad, at det er berettiget at anvende R 48.

R 64 Kan skade børn i ammeperioden

For stoffer og præparater, som indtages af kvinder, og som kan påvirke amningen, eller som kan være til stede (inklusive metabolitter) i modermælken i tilstrækkelige mængder til, at det kan blive sundhedsskadeligt for brystbørn.

Med hensyn til bemærkninger om anvendelsen af denne R-sætning (og i visse tilfælde R 33) henvises der til punkt 4.2.3.3.

R 66 Gentagen udsættelse kan give tør eller revnet hud

For stoffer og præparater, der kan give anledning til bekymring, fordi huden bliver tør, skaller af eller revner, men som ikke opfylder kriterierne for R 38

enten på grundlag af:

- praktiske observationer efter normal håndtering og anvendelse, eller
- relevant dokumentation vedrørende deres forudsagte virkninger på huden.

Se også punkt 1.6 og 1.7.

R 67 Dampe kan give sløvhed og svimmelhed

For flygtige stoffer og præparater, der indeholder stoffer, som forårsager klare symptomer på svækkelse af centralnervesystemet ved indånding, og som ikke allerede er klassificeret med hensyn til akut toksicitet ved indånding (R 20, R 23, R 26, R 40/20, R 39/23 eller R 39/26).

Følgende dokumentation kan anvendes:

- a) Data fra dyreforsøg, som viser tydelige tegn på svækkelse af centralnervesystemet, såsom narkotiske virkninger, letargi, svigtende koordinering (herunder tab af »righting reflex« — dvs. reflexen, der får dyret til at komme tilbage til opret stilling) og ataksi:
 - enten ved koncentrationer/eksponeringstider på højst 20 mg/l/4 h, eller
 - hvor forholdet mellem effektkoncentrationen ved op til 4 timer og den mættede dampkoncentration (SVC) ved 20 °C er mindre end eller lig med 1/10.
- b) Praktisk erfaring hos mennesker (f.eks. narkose, døsigthed, reduceret opmærksomhed, svigtende reflekser, svigtende koordinering, vertigo) fra veldokumenterede rapporter under eksponeringsvilkår, der er sammenlignelige med de ovenfor specificerede virkninger for dyr.

Se også punkt 1.6 og 1.7.

Se punkt 2.2.6 med hensyn til andre supplerende risikosætninger.

- 4.1.2. Hvis en fabrikant, forhandler eller importør er i besiddelse af oplysninger, der tyder på, at stoffet bør klassificeres og etiketteres i overensstemmelse med de i punkt 4.2.1, 4.2.2 eller 4.2.3 fastsatte kriterier, skal han midlertidigt etikettere stoffet i overensstemmelse med disse kriterier på grundlag af en kompetent persons vurdering af dokumentationen.
- 4.1.3. Fabrikanten, forhandleren eller importøren skal så hurtigt som muligt fremsende et skriftligt resumé af alle relevante oplysninger til en medlemsstat, hvor stoffet markedsføres. Resuméet skal omfatte en bibliografi med alle relevante referencer og eventuelt andre endnu ikke offentliggjorte relevante data.
- 4.1.4. Endvidere skal en fabrikant, forhandler eller importør, som er i besiddelse af nye data, som er relevante for klassificeringen og etiketteringen af et stof i overensstemmelse med de kriterier, der er anført i punkt 4.2.1, 4.2.2 eller 4.2.3, så hurtigt som muligt fremsende disse data til en medlemsstat, hvor stoffet markedsføres.

5.2.2. *Andre miljøer end vandmiljøet*

- 5.2.2.1. Stoffer klassificeres som farlige for miljøet og tildeles symbolet »N« samt den tilsvarende farebetegnelse, og der foreskrives risikosætninger efter følgende kriterier:

R 54: Giftig for planter

R 55: Giftig for dyr

R 56: Giftig for organismer i jordbunden

R 57: Giftig for bier

R 58: Kan forårsage uønskede langtidsvirkninger i miljøet

Stoffer, som på grundlag af de foreliggende beviser for deres egenskaber, persistens, akkumuleringspotentiel og deres forudsete eller observerede skæbne og opførsel i miljøet alligevel kan udgøre en øjeblikkelig eller langsigtet og/eller forsinket fare for struktur og/eller funktion af andre naturlige økosystemer end dem, der er omfattet af punkt 5.2.1. Detaljerede kriterier vil blive udarbejdet senere.

- 5.2.2.2. Stoffer klassificeres som farlige for miljøet og tildeles symbolet »N« samt de tilsvarende farebetegnelse, og der foreskrives risikosætninger efter følgende kriterier:

R 59: Farlig for ozonlaget

Stoffer, som på grundlag af de foreliggende beviser for deres egenskaber og deres forudsete eller observerede skæbne og opførsel i miljøet kan udgøre en fare for struktur og/eller funktion af ozonlaget i stratosfæren. Dette omfatter stoffer, der er nævnt i bilag I i Rådets forordning (EF) nr. 3093/94 om stoffer, der nedbryder ozonlaget (EFT L 333 af 22.12.1994, s. 1), med senere ændringer.

6.2. Sikkerhedssætninger for stoffer og præparater

S 1 Opbevares under lås

- Anvendes til:
 - meget giftige, giftige og ætsende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for ovennævnte stoffer og præparater, hvis de sælges til privat brug.

S 2 Opbevares utilgængeligt for børn

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for alle farlige stoffer og præparater, hvis de sælges til privat brug, undtagen de stoffer og præparater, der alene er farlige for miljøet.

S 3 Opbevares køligt

- Anvendes til:
 - organiske peroxider
 - andre farlige stoffer og præparater med kogepunkt $\leq 40^{\circ}\text{C}$.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for organiske peroxider, medmindre S 47 anvendes
 - anbefales til andre farlige stoffer og præparater med kogepunkt $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

S 4 Må ikke opbevares i nærheden af beboelse

- Anvendes til:
 - meget giftige og giftige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til meget giftige og giftige stoffer og præparater, hvis S 13 bør suppleres, f.eks. når der er fare ved indånding, og stoffet eller præparatet ikke bør opbevares i nærheden af beboelse. Sikkerhedssætningen udelukker ikke, at stoffet eller præparatet anvendes i nærheden af beboelse, når anvendelsen sker på rette måde.

S 5 Opbevares under ... (en egnet væske, som angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - selvantændelige faste stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde, f.eks. natrium, kalium eller hvid fosfor.

S 6 Opbevares under ... (en inaktiv gas, som angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - farlige stoffer og præparater, som skal opbevares under en inaktiv atmosfære.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde, f.eks. bestemte organiske metalforbindelser.

S 7 Emballagen skal holdes tæt lukket

- Anvendes til:
 - organiske peroxider
 - stoffer og præparater, som kan afgive meget giftige, giftige, sundhedsskadelige eller yderst brandfarlige dampe
 - stoffer og præparater, som afgiver yderst brandfarlige gasarter ved kontakt med fugt
 - meget brandfarlige faste stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for organiske peroxider
 - anbefales til de øvrige ovenfor nævnte anvendelsesområder.

S 8 Emballagen skal opbevares tørt

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der reagerer voldsomt med vand
 - stoffer og præparater, der ved kontakt med vand udvikler yderst brandfarlige gasarter
 - stoffer og præparater, der ved kontakt med vand udvikler meget giftige og giftige gasarter.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til ovennævnte anvendelsesområde, når det er nødvendigt at skærpe de advarsler, der gives især med R 14 og R 15 samt med R 29.

S 9 Emballagen skal opbevares på et godt ventileret sted

- Anvendes til:
 - flygtige stoffer og præparater, der kan udvikle meget giftige, giftige eller sundhedsskadelige dampe
 - yderst brandfarlige eller meget brandfarlige væsker og yderst brandfarlige gasarter.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales til flygtige stoffer og præparater, der kan udvikle meget giftige, giftige eller sundhedsskadelige dampe
 - anbefales til yderst brandfarlige og meget brandfarlige væsker og yderst brandfarlige gasarter.

S 12 Emballagen må ikke lukkes tæt

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der ved udvikling af gasarter eller dampe vil kunne sprænge emballagen.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til ovennævnte specielle tilfælde.

S 13 Må ikke opbevares sammen med fødevarer, drikkevarer og foderstoffer

- Anvendes til:
 - meget giftige, giftige og sundhedsskadelige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales, hvis det er sandsynligt, at de pågældende stoffer og præparater vil blive brugt privat.

S 14 Opbevares adskilt fra ... (uforligelige stoffer, som angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - organiske peroxider
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for og normalt begrænset til organiske peroxider. Kan også med fordel anvendes i ganske særlige tilfælde, når stoffets uforligelighed kan indebære en speciel risiko.

S 15 Må ikke udsættes for varme

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der kan spaltes eller reagerer spontant ved varmpåvirkning.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde, f.eks. monomerer, men ikke foreskrevet, hvis risikosætningerne R 2, R 3 og/eller R 5 allerede er anvendt.

S 16 Holdes væk fra antændelseskilder — rygning forbudt

- Anvendes til:
 - yderst brandfarlige eller meget brandfarlige væsker og yderst brandfarlige gasarter.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales til ovennævnte stoffer og præparater, men ikke foreskrevet, hvis risikosætningerne R 2, R 3 og/eller R 5 allerede er anvendt.

S 17 Holdes væk fra brændbare stoffer

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, som kan udvikle eksplosive eller selvantændelige blandinger med brændbart materiale.
- Anvendelseskriterier:
 - anvendes i særlige tilfælde, f.eks. understregning af R 8 og R 9.

S 18 Emballagen skal behandles og åbnes med forsigtighed

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater med tilbøjelighed til at frembringe overtryk i emballagen
 - stoffer og præparater, der kan udvikle eksplosive peroxider.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til ovennævnte tilfælde, når der er fare for øjenskader, og/eller hvis det er sandsynligt, at stofferne og præparaterne vil blive brugt privat.

S 20 Der må ikke spises eller drikkes under brugen

- Anvendes til:
 - meget giftige, giftige og ætsende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde (f.eks. arsen og arsenforbindelser; fluoracetater), især hvis det er sandsynligt, at de vil blive brugt privat.

S 21 Der må ikke ryges under brugen

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der udvikler giftige forbrændingsprodukter.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde (f.eks. halogenerede forbindelser).

S 22 Undgå indånding af støv

- Anvendes til:
 - alle faste stoffer og præparater, som er farlige for sundheden.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for de ovennævnte stoffer og præparater, for hvilke R 42 er foreskrevet
 - anbefales til ovennævnte stoffer og præparater, såfremt de leveres i form af støv, der kan indåndes, og de eventuelle sundhedsfarer ved indånding ikke kendes.

S 23 Undgå indånding af gas/røg/dampe/aerosoltåger (den eller de pågældende betegnelser angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - alle flydende og gasformige stoffer og præparater, som er farlige for sundheden
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for de ovennævnte stoffer og præparater, for hvilke R 42 er foreskrevet
 - obligatorisk for stoffer og præparater til sprøjtning. Der foreskrives endvidere enten S 38 eller S 51
 - anbefales, når det er nødvendigt at henlede brugerens opmærksomhed på fare ved indånding, som ikke fremgår af de foreskrevne risikosætninger.

S 24 Undgå kontakt med huden

- Anvendes til:
 - alle stoffer og præparater, som er farlige for sundheden.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for de ovennævnte stoffer og præparater, for hvilke R 43 er foreskrevet, medmindre S 36 også er foreskrevet
 - anbefales, hvis det er nødvendigt at henlede brugerens opmærksomhed på farer ved hudkontakt, som ikke fremgår af de foreskrevne risikosætninger (f.eks. paræstesi); kan også anvendes til understregning af sådanne risikosætninger.

S 25 Undgå kontakt med øjnene

- Anvendes til:
 - alle stoffer og præparater, som er farlige for sundheden.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales, hvis det er nødvendigt at henlede brugerens opmærksomhed på farer ved øjenkontakt, som ikke fremgår af de foreskrevne risikosætninger; kan også anvendes til understregning af sådanne risikosætninger
 - anbefales for stoffer, for hvilke R 34, R 35, R 36 eller R 41 er foreskrevet, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer vil blive brugt privat.

S 26 Kommer stoffet i øjnene, skylles der straks grundigt med vand, og læge kontaktes

- Anvendes til:
 - ætsende og lokalirriterende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for ætsende stoffer og præparater samt for stoffer og præparater, for hvilke R 41 er foreskrevet
 - anbefales for lokalirriterende stoffer og præparater, for hvilke risikosætningen R 36 allerede er foreskrevet.

S 27 Tilsmudset tøj tages straks af

- Anvendes til:
 - meget giftige, giftige og ætsende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for meget giftige stoffer og præparater, for hvilke R 27 er foreskrevet, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer vil blive brugt privat
 - anbefales for meget giftige stoffer og præparater, for hvilke R 27 er foreskrevet, og som anvendes i industrien. Denne sikkerhedssætning bør imidlertid ikke anvendes, hvis S 36 er foreskrevet
 - anbefales for giftige stoffer og præparater, for hvilke R 24 er foreskrevet, samt ætsende stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer vil blive brugt privat.

S 28 Kommer stof på huden, vaskes der straks med store mængder ... (angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - meget giftige, giftige eller ætsende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for meget giftige stoffer og præparater
 - anbefales til ovennævnte stoffer og præparater, især hvis vand ikke er den bedst egnede rensesvæske
 - anbefales for ætsende stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer vil blive brugt privat.

S 29 Må ikke tømmes i kloakfløb

- Anvendes til:
 - yderst brandfarlige og meget brandfarlige væsker, der ikke lader sig blande med vand
 - meget giftige og giftige stoffer og præparater
 - miljøfarlige stoffer.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for miljøfarlige stoffer, som har fået tildelt symbolet »N«, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer vil blive brugt privat, medmindre de direkte er beregnet til privat brug
 - anbefales til ovennævnte stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at de vil blive brugt privat, medmindre de direkte er beregnet til privat brug.

S 30 Hæld aldrig vand på eller i produktet

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der reagerer voldsomt med vand.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde (f.eks. svovlsyre), men kan efter omstændighederne anvendes til at gøre oplysningerne så tydelige som muligt, enten for at understrege R 14 eller som et alternativ til R 14.

S 33 Træf foranstaltninger mod statisk elektricitet

- Anvendes til:
 - yderst brandfarlige og meget brandfarlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales til industrimæssigt anvendte stoffer og præparater, der ikke absorberer fugtighed. Anvendes i realiteten aldrig til stoffer og præparater, der markedsføres til privat brug.

S 35 Stoffet og emballagen skal bortskaffes på en sikker måde

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales for stoffer og præparater, hvor der er behov for særlig vejledning af hensyn til sikker bortskaffelse.

S 36 Brug særligt arbejdstøj

- Anvendes til:
 - organiske peroxider
 - meget giftige, giftige eller sundhedsskadelige stoffer og præparater
 - ætsende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for meget giftige og ætsende stoffer og præparater
 - obligatorisk for de stoffer og præparater, hvor enten R 21 eller R 24 er foreskrevet
 - obligatorisk for kræftfremkaldende, mutagene og reproduktionstoksiske stoffer og præparater i kategori 3, medmindre virkningerne udelukkende fremkaldes ved indånding af stoffet eller præparatet
 - obligatorisk for organiske peroxider
 - anbefales for giftige stoffer og præparater, hvis LD₅₀-dermal-værdien ikke kendes, men stoffet eller præparatet sandsynligvis er giftigt ved hudkontakt
 - anbefales til industrimæssigt anvendte stoffer og præparater, som vil kunne være sundhedsskadelige ved vedvarende påvirkning.

S 37 Brug egnede beskyttelsehandsker under arbejdet

- Anvendes til:
 - meget giftige, giftige, sundhedsskadelige og ætsende stoffer og præparater
 - organiske peroxider
 - stoffer og præparater, der irriterer huden eller kan give overfølsomhed ved hudkontakt.

- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for meget giftige og ætsende stoffer og præparater
 - obligatorisk for de stoffer og præparater, hvor enten R 21, R 24 eller R 43 er foreskrevet
 - obligatorisk for kræftfremkaldende, mutagene og reproduktionstoksiske stoffer og præparater i kategori 3, medmindre virkningerne udelukkende fremkaldes ved indånding af stoffet eller præparatet
 - obligatorisk for organiske peroxider
 - anbefales for giftige stoffer og præparater, hvis LD₅₀-dermal-værdien ikke kendes, men stoffet eller præparatet sandsynligvis er sundhedsskadeligt ved hudkontakt
 - anbefales til stoffer og præparater, som irriterer huden.

S 38 Brug egnet åndedrætsværn, hvis effektiv ventilation ikke er mulig

- Anvendes til:
 - meget giftige og giftige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde, hvor meget giftige og giftige stoffer og præparater finder anvendelse i industri eller landbrug.

S 39 Brug beskyttelsesbriller/ansigtsskærm under arbejdet

- Anvendes til:
 - organiske peroxider
 - ætsende stoffer og præparater og lokalirriterende stoffer og præparater med tendens til at give alvorlige øjenskader
 - meget giftige og giftige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for de stoffer og præparater, hvor R 34, R 35 eller R 41 er foreskrevet
 - obligatorisk for organiske peroxider
 - anbefales, hvor det er nødvendigt at henlede brugerens opmærksomhed på farer ved øjenkontakt, som ikke er nævnt i de foreskrevne risikosætninger
 - normalt begrænset til meget giftige og giftige stoffer og præparater i ganske særlige tilfælde, når der er risiko for oversprøjtning, og de sandsynligvis let absorberes af huden.

S 40 Gulvet og tilsmudsede genstande renses med ... (angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til farlige stoffer og præparater, for hvilke vand ikke betragtes som et egnet rensningsmiddel (f.eks. hvor det er nødvendigt, at det absorberes af pulverformigt materiale, fortyndes med opløsningsmiddel osv.), samt hvor det af sundhedsmæssige og/eller sikkerhedsmæssige grunde er væsentligt, at etiketten påføres en advarsel.

S 41 Undgå at indånde røgen ved brand eller eksplosion

- Anvendes til:
 - farlige stoffer og præparater, der ved forbrænding udvikler meget giftige og giftige gasarter.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde.

S 42 Brug egnet åndedrætsværn ved rygning/sprøjtning (den eller de pågældende betegnelser angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater til denne anvendelse, der rummer fare for brugerens sundhed og sikkerhed, medmindre de rigtige forsigtighedsforanstaltninger er taget.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde.

S 43 Brug ... ved brandslukning (den nøjagtige type brandslukningsudstyr angives. Såfremt vand ikke må bruges, tilføjes der: »Brug ikke vand«)

- Anvendes til:
 - yderst brandfarlige, meget brandfarlige og brandfarlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for stoffer og præparater, som ved kontakt med vand eller fugtig luft udvikler yderst brandfarlige gasarter
 - anbefales til yderst brandfarlige, meget brandfarlige og brandfarlige stoffer og præparater, især hvis de ikke er blandbare med vand.

S 45 Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig (vis etiketten, hvis dette er muligt)

- Anvendes til:
 - meget giftige stoffer og præparater
 - giftige og ætsende stoffer og præparater
 - stoffer og præparater, som kan give overfølsomhed ved indånding.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for ovennævnte stoffer og præparater.

S 46 Ved indtagelse: kontakt omgående læge og vis denne beholder eller etiket

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater, undtagen meget giftige, giftige, ætsende og miljøfarlige.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for alle ovennævnte farlige stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at de vil blive brugt privat, medmindre der ikke er grund til at antage, at de er farlige at indtage, især for børn.

S 47 Må ikke opbevares ved temperaturer på over ... °C (angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der bliver ustabile ved en bestemt temperatur.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde (f.eks. visse organiske peroxider).

S 48 Holdes befugtet med ... (passende middel angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, som i tør tilstand kan blive meget følsomme for gnister, gnidning og stød.
- Anvendelseskriterier:
 - normalt begrænset til særlige tilfælde, f.eks. nitrocellulose.

S 49 Må kun opbevares i den originale emballage

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, der let nedbrydes katalytisk.
- Anvendelseskriterier:
 - stoffer og præparater, der let nedbrydes katalytisk, f.eks. visse organiske peroxider.

S 50 Må ikke blandes med ... (angives af fabrikanten)

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, som kan reagere med det angivne produkt og udvikle meget giftige og giftige gasarter
 - organiske peroxider.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales til ovennævnte stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at de vil blive brugt privat, såfremt R 31 eller R 32 ikke er bedre alternativer
 - obligatorisk for visse peroxider, som kan reagere voldsomt med acceleratorer og lignende stoffer.

S 51 Må kun bruges på steder med god ventilation

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater, som kan eller er beregnet til at frembringe damp, pulver, spray, gasarter, tåge osv., der kan medføre fare ved indånding, brand eller eksplosion.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales, hvis S 38 ikke bør anvendes. Den er derfor vigtig, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer og præparater vil blive brugt privat.

S 52 Bør ikke anvendes til større flader i beboelses- eller opholdsrum

- Anvendes til:
 - flygtige, meget giftige, giftige og sundhedsskadelige stoffer og præparater, som indeholder sådanne stoffer.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales for stoffer, der på grund af afdampning fra store behandlede overflader i beboelses- eller opholdsrum kan medføre sundhedsfare efter lang tids udsættelse for stoffet.

S 53 Undgå enhver kontakt — indhent særlige anvisninger før brug

- Anvendes til:
 - kræftfremkaldende, mutagene og/eller reproduktionstoksiske stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for ovennævnte stoffer og præparater, for hvilke der er foreskrevet mindst en af følgende R-sætninger: R 45, R 46, R 49, R 60 eller R 61.

S 56 Aflever dette materiale og dets beholder til et indsamlingssted for farligt affald og problemaffald

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales for alle farlige stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at de vil blive brugt privat, hvor der er behov for særlig bortskaffelse.

S 57 Skal emballeres forsvarligt for at undgå miljøforurening

- Anvendes til:
 - stoffer, som har fået tildelt symbolet »N«.
- Anvendelseskriterier:
 - begrænses normalt til stoffer, som ikke er beregnet til privat brug.

S 59 Indhent oplysninger om genvinding/genanvendelse hos fabrikanten/leverandøren

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for stoffer, der er farlige for ozonlaget
 - anbefales for andre stoffer og præparater, for hvilke genvinding/genanvendelse må anbefales.

S 60 Dette materiale og dets beholder skal bortskaffes som farligt affald

- Anvendes til:
 - alle farlige stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales for stoffer og præparater, som sandsynligvis ikke vil blive brugt privat, og hvor S 35 ikke er foreskrevet.

S 61 Undgå udledning til miljøet. Se særlig vejledning/sikkerhedsdatablad

- Anvendes til:
 - stoffer, som er farlige for miljøet.
- Anvendelseskriterier:
 - anvendes normalt for stoffer, som har fået tildelt symbolet »N«
 - anbefales til alle stoffer, der klassificeres som farlige for miljøet, og som ikke er omfattet ovenfor.

S 62 Ved indtagelse: undgå at fremprovokere opkastning; kontakt omgående læge og vis denne beholder eller etiket

- Anvendes til:
 - stoffer og præparater klassificeret som sundhedsskadelige med R 65 i overensstemmelse med kriterierne i punkt 3.2.3
 - anvendes ikke til stoffer og præparater, som markedsføres i aerosolbeholdere eller i beholdere, som er forsynet med en uaftagelig sprayanordning (se punkt 8 og 9).
- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for ovennævnte stoffer og præparater, hvis de sælges til eller er beregnet til privat brug, medmindre S 45 eller S 46 er obligatorisk
 - anbefales for ovennævnte stoffer og præparater, når de anvendes i industrien, medmindre S 45 eller S 46 er obligatorisk.

S 63 Ved ulykkestilfælde ved indånding bringes tilskadekomne ud i frisk luft og holdes i ro

- Anvendes til:
 - meget giftige og giftige stoffer og præparater (gas, damp, partikler, flygtige væsker)
 - stoffer og præparater, som kan give overfølsomhed ved indånding.

- Anvendelseskriterier:
 - obligatorisk for stoffer og præparater, for hvilke der er foreskrevet R 26, R 23 eller R 42, hvis det er sandsynligt, at disse stoffer og præparater vil blive brugt privat på en måde, som kan medføre indånding.

S 64 Ved indtagelse: skyl munden med vand (kun hvis personen er ved bevidsthed)

- Anvendes til:
 - ætsende eller lokalirriterende stoffer og præparater.
- Anvendelseskriterier:
 - anbefales for ovennævnte stoffer og præparater, hvis det er sandsynligt, at de vil blive brugt privat, og hvor ovennævnte behandling er egnet.

7.5.2. Valg af sikkerhedssætninger

Ved det endelige valg af sikkerhedssætninger skal de på etiketten anførte risikosætninger og den tilsigtede brug af stoffet eller præparatet tages i betragtning:

- I almindelighed vil indtil fire S-sætninger være tilstrækkelig til at beskrive de vigtigste sikkerhedsforskrifter; i denne sammenhæng betragtes kombinationssætningerne i bilag IV som enkelt-sætninger.
- Med hensyn til S-sætningerne vedrørende bortskaffelse skal der anvendes en S-sætning, medmindre det er klart, at bortskaffelse af stoffet og beholderen ikke udgør nogen fare for menneskers sundhed eller miljøet. Rådgivning om sikker bortskaffelse er især vigtig for stoffer og præparater, der sælges til private.
- Nogle R-sætninger bliver overflødige, hvis der foretages en omhyggelig udvælgelse af S-sætninger, og omvendt. S-sætninger, som klart svarer til R-sætninger, bør kun forekomme på etiketten, såfremt en særlig advarsel ønskes fremhævet.
- Ved valg af sikkerhedssætninger må man være særlig opmærksom på de anvendelsesmåder, som kan forudses for visse stoffer og produkter, f.eks. sprøjtning eller anden aerosolvirkning. Sætningerne skal vælges ud fra den tilsigtede anvendelse.
- Sikkerhedssætningerne S 1, S 2 og S 45 er obligatoriske for alle meget giftige, giftige og ætsende stoffer og præparater, som sælges til privat brug.
- Sikkerhedssætningerne S 2 og S 46 er obligatoriske for alle andre farlige stoffer og præparater (undtagen de stoffer og præparater, der alene er farlige for miljøet), som sælges til privat brug.

Såfremt sætningerne udvalgt efter de strenge kriterier i punkt 6.2 medfører overflødighed eller tvivl eller klart er unødvendige i betragtning af det specifikke produkt eller den specifikke emballage, kan nogle sætninger udgå.

8. SÆRLIGE TILFÆLDE: Stoffer

8.1. Mobile gasflasker

For mobile gasflasker anses etiketteringskravene for at være opfyldt, når de er i overensstemmelse med artikel 23 eller artikel 24, stk. 6, litra b).

Som undtagelse fra artikel 24, stk. 1 og 2, kan et af følgende alternativer imidlertid anvendes til gasflasker med en vandkapacitet på mindre end eller lig med 150 l:

- etikettens udformning og dimensioner kan følge forskrifterne i ISO-standard ISO/DP 7225
- de i artikel 23, stk. 2, anførte oplysninger kan anbringes på en permanent informationsplade eller -etiket fastgjort på gasflasken.

8.2. **Gasbeholdere til propan, butan eller flaskegas (LPG)**

Disse stoffer er klassificeret som farlige i bilag I. Selv om de er klassificeret som farlige i overensstemmelse med artikel 2, udgør de ikke nogen sundhedsfare, når de markedsføres i lukkede genfyldelige gasbeholdere eller i engangsbeholdere, som omhandlet i EN 417, som brændstoffer, der kun lukkes ud til forbrænding.

Disse beholdere skal mærkes med det relevante symbol og R- og S-sætningerne for brandfarlighed. Der kræves ingen oplysninger på etiketten om virkningerne på menneskers sundhed. Oplysninger om virkningerne på menneskers sundhed, der ellers skulle have stået på etiketten, skal dog fremsendes til den erhvervsmæssige bruger af den, der er ansvarlig for markedsføringen af stoffet. Oplysningerne gives som foreskrevet i direktivets artikel 27. Brugere skal have tilstrækkelig information til at kunne træffe de fornødne foranstaltninger med henblik på beskyttelse af sundhed og sikkerhed, som fastsat i artikel 1, stk. 3, i direktiv 91/155/EØF, ændret ved direktiv 93/112/EØF.

8.3. **Massive metaller**

Disse stoffer er klassificeret i bilag I eller skal klassificeres efter artikel 6. Nogle af disse stoffer udgør imidlertid, selv om de er klassificeret i overensstemmelse med artikel 2, ikke nogen fare for sundheden ved indånding, indtagelse eller hudkontakt eller for vandmiljøet i den form, hvori de markedsføres. Sådanne stoffer kræver ikke nogen etiket i henhold til artikel 23. Alle de oplysninger, der ellers skulle have forekommet på etiketten, skal imidlertid meddeles til brugeren af den person, der er ansvarlig for markedsføringen af metallet i et format som omhandlet i artikel 27.

8.4. **Stoffer klassificeret med R 65**

Stoffer, der er klassificeret som sundhedsskadelige på grund af fare ved aspiration, skal ikke nødvendigvis etiketteres som sundhedsskadelige med R 65, når de markedsføres i aerosolbeholdere eller i beholdere, som er forsynet med en uaftagelig sprayanordning.«
