

Svensk utgåva

## Lagstiftning

Innehållsförteckning

I Rättsakter vilkas publicering är obligatorisk

- ★ **Kommissionens direktiv 2000/32/EG av den 19 maj 2000 om anpassning till tekniska framsteg för tjugosjätte gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen<sup>(1)</sup>** ..... 1
- ★ **Kommissionens direktiv 2000/33/EG av den 25 april 2000 om anpassning till tekniska framsteg för tjugosjunde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen<sup>(1)</sup>** ..... 90

II Rättsakter vilkas publicering inte är obligatorisk

### Kommissionen

2000/368/EG:

- ★ **Kommissionens beslut av den 19 maj 2000 om rättelse av direktiv 98/98/EG om anpassning till tekniska framsteg för tjugofemte gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen<sup>(1)</sup> [delgivet med nr K(2000) 1333]** ..... 108

Pris: 24,50 EUR

<sup>(1)</sup> Text av betydelse för EES.

SV

De rättsakter vilkas titlar är tryckta med fin stil är sådana rättsakter som har avseende på den löpande handläggningen av jordbrukspolitiska frågor. De har normalt begränsad giltighetstid.

Beträffande alla övriga rättsakter gäller att titlarna är tryckta med fet stil och föregås av en asterisk.

## I

(Rättsakter vilkas publicering är obligatorisk)

**KOMMISSIONENS DIREKTIV 2000/32/EG**

av den 19 maj 2000

**om anpassning till tekniska framsteg för tjugosjätte gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (\*)**

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT  
DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen<sup>(1)</sup>, senast ändrat genom Europaparlamentets och rådets direktiv 1999/33/EG<sup>(2)</sup>, särskilt artikel 28 i detta, och

av följande skäl:

- (1) Bilaga I till direktiv 67/548/EEG innehåller en förteckning över farliga ämnen samt uppgifter om klassificering och märkning av varje ämne. Det nuvarande vetenskapliga och tekniska kunnandet har visat att förteckningen över farliga ämnen i den bilagan bör ändras. I vissa språkversioner av direktivet är det också nödvändigt att ändra vissa delar av förordet till bilaga I och tabell A i samma bilaga.
- (2) Bilaga III till direktiv 67/548/EEG innehåller en förteckning över de riskfraser som tilldelats farliga ämnen och preparat. Bilaga IV till direktiv 67/548/EEG innehåller en förteckning över de skyddsfraser som tilldelats farliga ämnen och preparat. Bilaga VI till direktiv 67/548/EEG innehåller riktlinjer för klassificering och märkning av farliga ämnen och preparat. I vissa språkversioner av direktivet är det nödvändigt att ändra vissa delar av bilagorna III, IV och VI.
- (3) I bilaga V till direktiv 67/548/EEG anges metoder för bestämning av fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet hos ämnen och preparat. Det är nödvändigt att anpassa denna bilaga till den tekniska utvecklingen.

(\*) Antagen efter den tjugosjunde anpassningen.

<sup>(1)</sup> EGT 196, 16.8.1967, s. 1.

<sup>(2)</sup> EGT L 199, 30.7.1999, s. 57.

(4) Bilaga IX till direktiv 67/548/EEG innehåller bestämmelser om barnsäkra förslutningsanordningar. Dessa bestämmelser bör anpassas och uppdateras. Det är nödvändigt att öka räckvidden för användningen av barnsäkra förslutningsanordningar.

(5) De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Kommittén för anpassning till tekniska framsteg av direktiv som syftar till att undanröja tekniska handelshinder avseende farliga ämnen och preparat.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

Direktiv 67/548/EEG ändras på följande sätt:

1. Bilaga I skall ändras på följande sätt:
  - a) Anmärkning Q i bilaga 1A till detta direktiv skall ersätta motsvarande anmärkning i förordet.
  - b) Raderna i bilaga 1B till detta direktiv skall ersätta motsvarande rader i tabell A.
  - c) Uppgifterna i bilaga 1C till detta direktiv skall ersätta motsvarande uppgifter.
  - d) Uppgifterna i bilaga 1D till detta direktiv skall införas.
2. Riskfrasen i bilaga 2 till detta direktiv skall ersätta motsvarande fras i bilaga III.
3. Bilaga IV skall ändras på följande sätt:
  - a) Skyddsfraserna i bilaga 3A till detta direktiv skall ersätta motsvarande fraser i bilaga IV.

- b) De sammansatta skyddsfraserna i bilaga 3B till detta direktiv skall ersätta motsvarande fraser i bilaga IV.
4. Del B i bilaga V skall ändras på följande sätt:
- a) Texten i bilaga 4A till detta direktiv skall ersätta avsnitt B.10.
- b) Texten i bilaga 4B till detta direktiv skall ersätta avsnitt B.11.
- c) Texten i bilaga 4C till detta direktiv skall ersätta avsnitt B.12.
- d) Texten i bilaga 4D till detta direktiv skall ersätta avsnitt B.13 och B.14.
- e) Texten i bilaga 4E till detta direktiv skall ersätta avsnitt B.17.
- f) Texten i bilaga 4F till detta direktiv skall ersätta avsnitt B.23. Rubriken på avsnitt B.23 i den förklarande anmärkningen skall ändras på motsvarande sätt.
- g) Texten i bilaga 4G till detta direktiv skall läggas till.
5. Fjärde strecksatsen i den allmänna inledningen till del C i bilaga V skall utgå.
6. Texten i bilaga 5 till detta direktiv skall ersätta motsvarande text i bilaga VI.
7. Bilaga IX skall ändras i enlighet med bilaga 6 till detta direktiv.

*Artikel 2*

1. Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv senast den 1 juni 2001. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

2. Medlemsstaterna skall till kommissionen överlämna texterna till centrala bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv.

*Artikel 3*

Detta direktiv träder i kraft den tredje dagen efter det att det offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

*Artikel 4*

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 19 maj 2000.

På kommissionens vägnar  
Margot WALLSTRÖM  
Ledamot av kommissionen

## BILAGA 1A

## FÖRORD TILL BILAGA I

**Förklaring till anmärkningarna om identifiering, klassificering och märkning av ämnen**

DA:

Note Q:

Klassificeringen som kräfftfremkaldende 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.

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DE versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

\_\_\_\_\_

## BILAGA IB

## TABELL A

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

## BILAGA IC

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
006-011-00-7	karbaryl (ISO) 1-nafylmetylkarbamat		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	metannatrium (ISO) natriummetylditiokarbamat		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) 3-(3,4-diklorfenyl)-1,1-dimetylurea		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-(1-metyloetoxifenyl)metylkarbamat		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	aldikarb (ISO) 2-metyl-2-(metyltio)propanal-O-[(metyl- amino)karbonyl]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	aminokarb (ISO) 4-(dimetyllamino)-3-metylfenylmetylkarbamat		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-diklor-2-propenyl)bis(1-metyletyl)kar- bamotioat		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-klorbut-2-ynyl-N-(3-klorfenyl)karbamat		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	metiokarb (ISO) 3,5-dimetyl-4-(metyltio)fenylmetylkarbamat		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-natrium (ISO) natriumisopropylxantat		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
006-026-00-9	karbofuran (ISO) 2,3-dihydro-2,2-dimetyl-7-benzofuranymetylkarbamat		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-sek-butyl-4,6-dinitrofenylisopropylkarbonat		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	dioxakarb (ISO) 2-(1,3-dioxalan-2-yl)fenylmetylkarbamat		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,N-dimetyl-N'-(3-klor-4-metoxifenyl)urea		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulat S-propylbutyletylkarbamotioat		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	pirimikarb (ISO) 2-(dimetylamino)-5,6-dimetyl-4-pyrimidinyldimetylkarbamat		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	promekarb (ISO) 3-metyl-5-(1-metyletyl)fenylmetylkarbamat		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) S-(2-klor-2-propenyl)dietylkarbamoditioat	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	triallat (ISO) S-(2,3,3-triklor-2-propenyl)bis(1-metyletyl)tiokarbamat		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) 1,1-dimetyl-3-(4-klorfenyl)urea		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 1,1-dimetyl-3-(4-klorfenyl)uroniumtrikloracetat		—	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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
006-045-00-2	metomyl (ISO) S-metyl-N-[[metylamino]karbonyl]oxi]etanimidotoat		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	bendiokarb (ISO) 2,2-dimetyl-1,3-benzodioxol-4-ylmetylkarbamat		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	bufenkarb (ISO) 3-(1-metylbutyl)fenylmetylkarbamat, blandning med 3-(1-etylpropyl)fenylmetylkarbamat		—	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	etiofenkarb (ISO) 2-[(etyl)io)metyl]fenylmetylkarbamat		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-dimetylfenyluroniumtrikloracetat		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2)-60-61		
006-053-00-6	isoprokarb (ISO) 2-(1-metyletyl)fenylmetylkarbamat		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	mexakarat (ISO) 4-(dimetylamino)-3,5-dimetylfenylmetylkarbamat		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-klor-6-(triklormetyl)pyridin		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	oxikarboxin (ISO) 5,6-dihydro-2-metyl-N-fenyl-1,4-oxatiin-3-karboxamid-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	tiofanatmetyl (ISO) dimetyl[[1,2-fenylenbis(iminokarbonotioyl)]bis-karbamat		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	furmecyklox N-cyclohexyl-N-metoxi-2,5-dimetyl-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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
006-088-00-7	benfurakarb (ISO) 2,3-dihydro-2,2-dimetyl-7-benzofuran-yl-2-mety- tyl-4-(1-metylyl)-7-oxo-8-oxa-3-tia-2,4-diaza- dekanooat		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
007-012-00-5	1,1-dimetylhydrazin	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-dimetylhydrazin	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	fluorvätesyra ... %	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	azinfosetyl (ISO) O,O-dimetyl-S-[(4-oxobenzotriazin-3-yl)mety- tyl]ditiiofosfat		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: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fention (ISO) O,O-dimetyl-O-(4-metyltio-3-metylfenyl)tio- fosfat		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: (1/2-36/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinfosetyl (ISO) O,O-dietyl-S-[(4-oxobenzotriazin-3-yl)metyll ditiiofosfat		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazofos (ISO) O,O-dietyl-O-1-fenyl-1,2,4-triazol-3-yl)tio- fosfat		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
016-013-00-X	svaveldiklorid		234-129-0	10545-99-0	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	

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
016-014-00-5	svaveltetraklorid		—	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	dimetylsulfat	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(metoxitiokarbonyl)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-6,1,3-diklor-10-((3-((4-klor-6-(2-sulfofenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)propyl)amino)-4,1,1-trifenoxidiox-azindisulfonat		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-22-24-37		
022-001-00-5	titantetraklorid		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	dimetylzink [1] dietylzink [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) tricyclohexylsilanol		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkningar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkningar som gäller beredningar
050-012-00-5	tetracyklohexylstannan [1] klortricyklohexylstannan [2] butyltricyklohexylstannan [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	fenbutatennoxid (ISO) bis[tris(2-metyl-2-fenylpropyl)teinn]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	blykromatsulfat [Detta ämne identifieras av Colour Index Constitution Number, C.I. 77 603.]		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	blykromatmolybdatsulfat [Detta ämne identifieras av Colour Index Constitution Number, C.I. 77 605.]		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	kumen [1] isopropylbenzen [2] 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	benz[a]pyren benz[def]krysen		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[e]acefenantrilen benz[b]fluoranten		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-diklorobenzen p-diklorobenzen		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-jodpropen allyljodid		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2)-7-26-45		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
603-076-00-9	but-2-yn-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-metyl-4-(1-metyletyl)-7-oxabicyklo [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-metyl-4-(1-metyletyl)-2-[(2-metylfenyl)metoxyl]-7-oxabicyklo[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''-nitritotripropan-2-ol triisopropanolamin		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2)-26-61		
603-117-00-0	2-propanol propan-2-ol isopropanol		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	2-fenylfenol (ISO) bifenyl-2-ol 2-hydroxybifenyl		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	natrium-2-bifenylat 2-fenylfenol, natriumsalt		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'-isobutyletylidendifenol		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-klor-4-(trifluorometyl)fenoxyl]-2-nitroben- zoesyra [1] natrium-5-[2-klor-4-(trifluorometyl)fenoxyl]-2-ni- trobenzoat [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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
604-043-00-1	monobenzon 4-(fenylnitro)fenol		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	4-metoxifenol mekvinoxol		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-(2-dimetyl-1-oxopropyl)-1H-inden-1,3-(2H)- 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	diklon (ISO) 2,3-diklor-1,4-naftokion		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	klordekon (ISO)		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-(1,1-dimyletyl)-3-(metyltio)- 1,2,4-triazin-5(4H)-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	kloridazon (ISO) 5-amino-4-klor-2-fenylpyridazin-3-(2H)-on		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	kinometonat (ISO) 6-metyl-1,3-ditolo[4,5-b]kinoxalin-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-klorfenoxi)-3,3-dimetyl-1-(1,2,4-triazol- 1-yl)butanon		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkning som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkning som gäller beregningar
606-044-00-2	2,4,6-trimetylbenzofenon		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	dikamba (ISO) 3,6-diklor-2-metoxibenzoesyra		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	kumaklor (ISO) 4-hydroxi-3-[1-(4-klorfenyl)-3-oxobutyl]-2-benzopyron		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	fumarin 4-hydroxi-3-[1-(2-furanyl)-3-oxobutyl]-2-benzopyron		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)		—	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-trikarboxylsyra-1,2-anhydrid trimellitisyraanhydrid		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	valeriansyra pentansyra		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-triklorbenzoesyra		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-klor-2-oxo-3(2H)-benzotiazolätriksyra		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	klorfensol (ISO) 4-klorfenyl-4-klorbensensulfonat		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	natriumkloracetat		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
607-159-00-0	klorbensilat (ISO) etyl-4-klor- $\alpha$ -(4-klorfenyl)- $\alpha$ -hydroxibenzenacetat		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	Blandning av: $\alpha$ -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxifenyl)propionyl- $\omega$ -hydroxipoly(oxietylen); $\alpha$ -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxifenyl)propionyl- $\omega$ -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxifenyl)propionylloxipoly(oxietylen)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-36/37-61		
607-188-00-9	natriumväte-N-karboxylatoetyl-N-oktadec-9-enylmaleamat		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24/37-61		
607-209-00-1	Blandning av: O,O-di(1-metylyl)tritiobisioformat; O,O-di(1-metylyl)tetratiobisioformat; O,O-di(1-metylyl)pentatiobisioformat		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	etyl-3,3-bis[(1,1-dimetylpropyl)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)-3/7-14-3-3-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-etoxyetyl-2-(4-(2,6-dihydro-2,6-dioxo-7-fenyl-1,5-dioxaindacen-3-yl)fenoxi)acetat		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-24-37-61		
607-243-00-7	natrium-3,6-diklor-2-metoxibenzoat [1] dikamba, natriumsalt [1] ditanolammonium-3,6-diklor-2-metoxibenzoat [2] etanolammonium-3,6-diklor-2-metoxibenzoat [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 natrium-2-[(1-naftalenylamino)karbonyl]benzoat		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkning som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkning som gäller beregningar
607-249-00-X	(1-metyl-1,2-etandiy)bis[oxi(metyl-2,1-etandiy)]diakrylat tripropylenglykoldiakrylat		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-cyhalorin (ISO) (Z)-[(1R) och (1S)]-cis(α-cyano-3-fenoxibenzyl-3-(2,2-diklorovinyl)-2-dimetylcyklopropankarboxylat		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	fluroxipyr (ISO) [(4-amino-3,5-dikloro-6-fluoro-2-pyridyl)oxi]ättiksyra		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	akrylonitril	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-tetraklorbenzen		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-(1,1-dimetyletyl)-4,6-dinitrofenol	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) 1-(4-nitrofenoxi)-4,6-diklorbenzen	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	teknazen (ISO) 1,2,4,5-tetraklor-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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
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	trilitium-1-hydroxi-7-(3-sulfonatamilino)-2-[3-metyl-4-[2-metoxi-4-(3-sulfonatofenylazo)fenylazo]fenylazo]naffalen-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-iminocyklohexa-2,5-dienylidenmetylen)dianilinhydroklorid C.I. Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoxianilin o-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 1,1'-bifenyl-4,4'-diamin	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'-diaminodifenylmetan 4,4'-metylfendianilin	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	4,4'-bi-o-toluidin, salter 3,3'-dimetylbenzidin, salter	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-metyl-m-fenyldiamin 4-metyl-l-3-benzendiamin	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	1-piperazinetanamin		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
612-111-00-7	2-metyl- <i>m</i> -fenyldiamin 2-metyl-1,3-benzendiamin		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-metyl- <i>p</i> -fenyldiamin 2-metyl-1,4-benzendiamin		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	flumetralin (ISO) 2-klor-N-[2,6-dinitro-4-(trifluorometyl)fenyl]- N-etyl-6-fluorbenzenmetanamin		—	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 toluendiamin	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	morfamkvation 1,1'-bis(3,5-dimetylmorfolinokarbonylmetyl)- 4,4'-dipyridylumjon		—	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	triklorisocyanursyra		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-fenyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin benzoguanamin		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-042-00-5	imazalil (ISO) 1-[2-(allyloxi)-2-(2,4-diklorfenyl)ethyl]- 1 <i>H</i> -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	imazalilsulfat (ISO) 1-[2-(allyloxi)-2-(2,4-diklorfenyl)ethyl]-1 <i>H</i> -imida- zolumvätesulfat [1] (±)-1-[2-(allyloxi)-2-(2,4-diklorfenyl)ethyl]- 1 <i>H</i> -imidazolumvätesulfat [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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
613-066-00-6	terbumeton (ISO) 2-tert-butylamino-4-etylamino-6-metoxi-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	morfamkvatdiklorid [1] morfamkvatsulfat [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-oktyl)-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	hexakonazol (ISO) $\alpha$ -butyl- $\alpha$ -(2,4-diklorfenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-131-00-9	pyrokvilon (ISO) 1,2,5,6-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2,1-ij]kinolin-4-on		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-134-00-5	myklobutanil (ISO) $\alpha$ -butyl- $\alpha$ -(4-klorfenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-propannitril		—	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	metabenziazuron (ISO) N-2-benzotiazolyl-N,N'-dimetyllurea		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metsulfuronmetyl		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nikotin (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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
614-007-00-7	brucinsulfat [1] brucinmitrat [2] brucin-(R)-mono(1-metylheptyl)ftalat [3] brucin-(S)-mono(1-metylheptyl)ftalat [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	toluen-2,6-diisocyanat [1] 2-metyl-m-fenyldiisocyanat [1] toluen-2,4-diisocyanat [2] 4-metyl-m-fenyldiisocyanat [2] toluendiisocyanat [3] m-tolyldiisocyanat [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	kloramin T, natriumsalt natrium-N-klor-4-toluensulfonamid		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	pyrakarbolid (ISO) 3,4-dihydro-6-metyl-N-fenyl-2H-pyran-5-karboxamid		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	cymoxamil 2-cyano-N-[(etylamino)karbonyl]-2-(metoxiimino)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-naftylhydroperoxid tetralinhydroperoxid		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-)37-14-26 -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-dimetylbenzyl)peroxid dikumylperoxid		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-)37-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	dibenzoylperoxid		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-)37-14-36/37/39		
650-007-00-3	klordimeform (ISO) N'-(4-kloro-2-metylfenyl)-N,N-dimetylformamidin		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
650-008-00-9	draxoxolon (ISO) 4-(2-klorfenylhydrazono)-3-metyl-5-isoxazololon		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	klordimeformylhydroklorid N'-(4-klor-2-metylfenyl)-N,N-dimetylformamidhydroklorid		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) (S)- $\alpha$ -cyano-3-fenoxibenzyl-(S)-2-(4-klorfenyl)isovalerat		—	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		

## BILAGA ID

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
006-090-00-8	2-(3-jod-2-propynyloxi)etylfenylkarbamat		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	Blandning av: 1,3-dihex-5-en-1-yl-1,1,3,3-tetrametyldisiloxan; 1,3-dihexen-1-yl-1,1,3,3-tetrametyldisiloxan		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	kalcium-P,P'-(1-hydroxyetyl)bis(vätefosfonat) dihydrat		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Blandning av: tiobis(4,1-fenyl)en)-S,S',S',S'-tetrafenyldisulfoniumbisehexafluorofosfat;difenyl(4-fenyltiofenyl)sulfoniumhexafluorofosfat		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-metylfenoxi)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-difosfiro[5,5]lundekan		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	3-(hydroxifenylfosforyl)propansyra		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	benzen, C <sub>10</sub> -C <sub>13</sub> -alkylderivat		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenylbut-1-en		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	pentabromodifenyleter		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)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dikloro-1-fluorocetan		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(fenylmetoxi)naftalen		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
603-129-00-6	1-tert-butoxipropan-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2)-26-39		
603-130-00-1	Blandning av isomerer av: $\alpha$ -(dimetyl)bifenyl)- $\omega$ -hydroxipoly(oxyetylen)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-39-61		
603-131-00-7	(3:1) blandning av: 1-deoxi-1-[metyl-(1-oxododecyl)amino]-D-glucitol; 1-deoxi-1-[metyl-(1-oxotetradecyl)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-132-00-2	2-hydroximetyl-9-metyl-6-(1-metyletyl)-1,4-dioxaspiro[4,5]dekan		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	Blandning av: 3-[(4-amino-2-kloro-5-nitrofenyl)amino]propan-1,2-diol; 3,3'-(2-kloro-5-nitro-1,4-fenylendiimino)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	Blandning av substituerade dodecyl och/eller tetradecyldifenyletrar. Ämnet framställs med en Friedel-Craftsreaktion. Katalysatorn avlägsnas från reaktionsprodukten. Difenylettern substitueras slumpmässigt med C1-C10-alkylgrupper i positionerna C1 till C6. Linjära C12 och C14-alkylgrupper i förhållandet 50/50 används.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2',2"-nitrilotris(etanolato)]-1-N,O]bis[2-(2-metoxietoxi)etoxi]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-hydroxyetyl)amino)-2-nitrofenyl)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	Blandning av: 1-deoxi-1-[metyl-(1-oxohexadecyl)amino]-D-glucitol; 1-deoxi-1-[metyl-(1-oxooktadecyl)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetyl-3-hydroxietyl)toluen; synonymn: 2,2-dimetyl-3-(3-metylfenyl)-1-propanol		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beräkningar
604-050-00-X	4-kloro-o-kresol 4-kloro-2-metylfenol		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-hydroxi)benzyl)- 2,4,6-trimetylfenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-metylenbis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)- 4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)fenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-metyl-4-(1,1-dimetyletyl)-6-(1-metylpentade- cyl)fenol		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	Blandning av: 2-metoxi-4-(tetrahydro-4-mety- len-2H-pyran-2-yl)fenol; 4-(3,6-dihydro-4-metyl- 2H-pyran-2-yl)-2-metoxifenol		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'-tetrametyl-(1,1'-bifenyl)- 4,4'-diyl)bis(oximetylen))bisoxiran		413-900-7	85954-11-6	Muta.Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2)-22-36-37		
605-027-00-7	Blandning av: 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-me- tano-1H-inden-6-karboxaldehid; 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-metano-1H-inden- 5-karboxaldehid		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
606-051-00-0	4-pentylcyklohexanon		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutylamino)-2-hydroxi- 2'-karboxibenzofenon		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluoroxipyr-meptyl (ISO) [1] fluoroxipyr-butometyl (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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
607-273-00-0	ammonium-7-(2,6-dimetyl-8-(2,2-dimetylbutyryloxi)-1,2,6,7,8,8a-hexahydro-1-naftyl)-3,5-dihydroxheptanoat		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-benzyl-N-metylamino)etyl-3-amino-2-bute-noat		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	natriumbenzoyloxibenzen-4-sulfonat		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-276-00-7	bis[(1-metylimidazol)-(2-ethylhexanoat)], zink-komplex		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	Blandning av: 2-(hexyltio)etylaminhydroklorid och 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	Blandning av isomerer av natriumfenyletylnaf-talensulfonat och natriumnaftyletylbenzenesul-fonat		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	Blandning av: 2,2-(n-oktadecylimino)bis(etylvä-temaleat); 2,2-(n-oktadecyli-mino)(etylvätemaleat)(etylvätefatat)		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-280-00-9	natrium-4-klor-1-hydroxibutan-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	Blandning av förgrenade och linjära C7-C9-alkyl-3-[3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-(1,1-dimetyle-tyl)-4-hydroxifenyl]propionater		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-acetoximetyl-4-benzoyloxibut-1-ylacetat		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beräkningar
607-283-00-5	(E)-etyl-4-oxo-4-fenylkrotonat		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	Blandning (9:1) av: natrium-3,3'-(1,4-fenylenbis(karboxylimino-3,1-propandiyiminio))bis(10-amino-6,1,3-diklor)-4,11-trifenodioxazindisulfonat; litium-3,3'-(1,4-fenylenbis(karboxylimino-3,1-propandiyiminio))bis(10-amino-6,1,3-diklor)-4,11-trifenodioxazindisulfonat)		410-040-4	136213-76-8	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Blandning av: 7-((3-amino-fenyl)sulfonyl)amino-naftalen-1,3-disulfonsyra; natrium-7-((3-amino-fenyl)sulfonyl)amino-naftalen-1,3-disulfonat; kalium-7-((3-amino-fenyl)sulfonyl)amino-naftalen-1,3-disulfonat		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-286-00-1	Blandning av: natrium/kalium-7-[[[3-[[4-((2-hydroxinaftyl)azo)fenyl]azo]fenyl]sulfonyl]amino]naftalen-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'-metyl-O-(1-metyl-2-metakryloyloxi-etyl)-1,2,3,6-tetrahydroföfalat		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	tetranatrium-(C-(3-(1-(3-(e,6-dikloro-5-syanopyrimidin-f-yl(metyl)amino)propyl)-1,6-dihydro-2-hydroxi-4-metyl-6-oxo-3-pyridyl)azo)-4-sulfonatonofenylsulfamoyl)talocyanin-a,b,d-trisulfonato(6-))nickelat II, där a är 1 eller 2 eller 3 eller 4; b är 8 eller 9 eller 10 eller 11, c är 15 eller 16 eller 17 eller 18, d är 22 eller 23 eller 24 eller 25 och där e och f tillsammans är 2 och 4 eller 4 och 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-dimetylpropyl)fenoxi)butylaminokarbonyl-4-hydroxi-1-naftalenylo)tio)propansyra		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Blandning (förhållande okänt) av: ammonium-1-C14-C18-alkyloxikarbonyl-2-(3-allyloxi-2-hydroxi-propoxikarbonyl)etan-1-sulfonat; ammonium-2-C14-C18-alkyloxikarbonyl-1-(3-allyloxi-2-hydroxi-propoxikarbonyl)etan-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-cykloalkyl)alkylkarboxylat; synonymi: Dodecylnaftenat		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
607-292-00-4	Blandning av: [1-(metoximetyl)-2-(C12-alkoxi)-etoxijättiksyra; [1-(metoximetyl)-2-(C14-alkoxi)-etoxijättiksyra		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	Blandning av: N-aminoethylpiperazoniummono-2,4,6-trimetylnonyldifenyleterdisulfonat; N-aminoethylpiperazoniumdi-2,4,6-trimetylnonyldifenyleterdisulfonat		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-benzoyloxi-1-hydroxietansulfonat		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-295-00-0	Blandning av: tetranatriumfosfooctan-1,2-dikarboxylat; hexanatriumfosfobutan-1,2,3,4-tetrakarboxylat		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-296-00-6	Blandning av: tetrastrar av pentaerytriol med heptansyra och 2-etylhexansyra		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E,E)-3,3'-(1,4-fenylendimetyliden)bis(2-oxobornan-10-sulfonsyra)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
607-298-00-7	2-(trimetylammonium)etoxikarboxibenzen-4-sulfonat		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-36/37		
607-299-00-2	metyl-3-(acetyltio)-2-metylpropanoat		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-kloro-2,6-difluoropyrimidin-4-ylamino)-5-(β-sulfamoyl-c-d-sulfonatofalocyanin-α-yl)-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonylamino]benzoato(5-)]kupraat(II) där 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	Blandning av: dodekansyrarpoly(1-7)laktatestrar av dodekansyra		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beräkningar
607-302-00-7	Blandning av: tetradekansyra; poly(1-7)laktatesslerar av tetradekansyra		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 Ni; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-cyklopropyl-6,7-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-kinolin-3-karboxylsyra		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-klorfenyl)-2-fenyl-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)metyl]butannitril		406-140-2	114369-43-6	Ni; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butyl-N-fenyletylamino)fenyl)etylen-1,1,2-trikarbonitril		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benzyloxi)fenylacetonnitril		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hydrazintrinitrometan		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-brom-1-(2-furyl)-2-nitroeten		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	Blandning (2:1:1) av: trinitrium-N(1'-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6-[2-amino-4-(eller 6)-hydroxi-(eller 4-amino-2-hydroxi)fenylazo]-6''-(1-karbaniloyl)-2-hydroxi-prop-1-enylazo)-5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonatobis(naftalen-2,1'-azo-benzen-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-kromat; trinitrium-N(1'-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis(1-karbaniloyl)-2-hydroxi-prop-1-enylazo)-5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonatobis(naftalen-2,1'-azo-benzen-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-kromat; trinitrium-N(1'-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis[2-amino-4-(eller 6)-hydroxi-(eller 4-amino-2-hydroxi)fenylazo]5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonatobis(naftalen-2,1'-azo-benzen-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-kromat		402-850-1		Xi; R41 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkningar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkningar som gäller beredningar
611-044-00-0	Blandning av: (C12-C14)-tert-alkylammonium-bis[1-[(2-hydroxi-5-nitrofenyl)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromat(1-);(C12-C14)-tert-alkylammonium-bis[1-[(2-hydroxi-4-nitrofenyl)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromat(1-);(C12-C14)-tert-alkylammonium-bis[1-[[5-(1,1-dimetylpropyl)-2-hydroxi-3-nitrofenyl]azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromat(1-);(C12-C14)-tert-alkylammonium-[[1-[(2-hydroxi-5-nitrofenyl)azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hydroxi-5-nitrofenyl)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromat(1-);(C12-C14)tert-alkylammonium-[[1-[[5-(1,1-dimetylpropyl)-2-hydroxi-3-nitrofenyl]azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hydroxi-5-nitrofenyl)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromat(1-);(C12-C14)tert-alkylammonium-[[1-[[5-(1,1-dimetylpropyl)-2-hydroxi-3-nitrofenyl]azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hydroxi-5-nitrofenyl)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromat(1-);(C12-C14)-tert-alkylammonium((1-(4(e)l-ter 5)-nitro-2-oxido-fenylazo)-2-naftolato)(1-(3-nitro-2-oxido-5-penylfenylazo)-2-naftolato))kromat(1-)		403-720-7	117527-94-3	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acetoxibutyl)-N-etyl]amino-2-metyl-fenylazo]-3-acetyl-5-nitrotiofen		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-metylazobenzen		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	(1:1) blandning av: 2-[[4-[N-etyl-N-(2-acetoxietyl)amino]fenyl]azo]-5,6-diklorobenzotiazol;2-[[4-[N-etyl-N-(2-acetoxietyl)amino]fenyl]azo]-6,7-diklorobenzotiazol		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	(1:1) blandning av: 2-[[4-[bis(2-acetoxietyl)amino]fenyl]azo]-5,6-diklorobenzotiazol;2-[[4-[bis(2-acetoxietyl)amino]fenyl]azo]-6,7-diklorobenzotiazol		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beräkningar
611-049-00-8	7-[4-(3-diethylaminopropylamino)-6-(3-diethylamino)propylamino]-1,3,5-triazin-2-ylamino]-4-hydroxi-3-(4-fenylazofenylazo)naftalen-2-sulfonsyra, ättiksyra, mjölksyra (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-etyl-N-(2-hydroxietyl)amino-2-metylfe-nyl)azo-6-metoxi-3-metylbenzotiazoliumklorid		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	mononatrium-[5-[[2,4-dihydroxi-5-[(2-hydroxi-3,5-dinitrofenyl)azo]fenyl]azo]-2-naftalensulfonat], järnkomplex, hydrat		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Blandning av: trihexadecylmetylammoniumklorid; dihexadecyldimetylammoniumklorid		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]tien-2-yltanonoximhydroklorid		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	Blandning av: bis(5-dodecyl-2-hydroxi-benzal-doximat)koppar (II) C12-alkylgruppen är för-grenad; 4-dodekylsalicylaldoxim		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Reaktionsprodukter av: trimetylhexametylendi-amin (är en blandning av 2,2,4-trimetyl-1,6-hexandiamin och 2,4,4-trimetyl-1,6-hex-andiamin, listade i EINECS), Epoxide 8 (mono[(C10-C16-alkyloxi)metyl]oxiran) och p-toluensulfonsyra		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-butylbenzyl)to-4-klorpyri-dazin-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-diyldipropyl)bis(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[1,2-a]n[3,8]fen-antrolin-1,3,6-trion		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Index-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
613-151-00-8	1-(2-dioxi-3-metylsulfonyloxi-5-trifenyloxiimetyl)tymin		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	fenyl-N-(4,6-dimetoxypyrimidin-2-yl)karbamat		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-trikloropyridin		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-kloro-6-metoxypyrimidin		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)-22		
613-155-00-X	5-kloro-2,3-difluoropyridin		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-betyl-4-kloro-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-metoximetylpyrimidin		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-dikloro-5-trifluorometylpyridin		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-dimetyl)fenyl]etoxi]kinazolin; synonym: fenazakin		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-metyl-2,5-diazobicyklo[2.2.1]heptandi- hydrobromid		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
615-022-00-1	metyl-3-isocyanatosulfonyl-2-tiofenkarboxylat		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-nummer	Kemiskt namn	Anmärkingar som gäller ämnen	EG-nr	CAS-nummer	Klassificering	Märkning	Koncentrationsgränser	Anmärkingar som gäller beredningar
615-023-00-7	2-(isocyanatosulfonylmetyl)benzoesyra, metylester, synonym: metyl-2-(isocyanatosulfonylmetyl)benzoat		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-diklor-4-etyl-2-hydroxifenyl)-2-(3-pentadecylfenoxi)butanamid		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-klor-3-cyano-5-formyl-2-tienylazo)-5'-dietylamino-2-metoxiacetamid		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-klor-7-metylpyrazolo(1,5-b)-1,2,4-triazol-4-yl)propyl)-2-(2,4-di-tert-pentylfenoxi)oktanamid		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Blandning av: 2,2',2'',-(etylendinitril)otetrakis-N,N-di(C16)alkylacetamid; 2,2',2'',-(etylendinitril)otetrakis-N,N-di(C18)alkylacetamid		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorometylisobutylamid		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-dimetylyl)fenoxi)-N-(3,5-dikloro-4-etyl-2-hydroxifenyl)-hexanamid		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-dikloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)fenylaminokarbonyl]-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	Blandning av: 2,4-bis(N'-(4-metylfenyl)-ureido)toluen; 2,6-bis(N'-(4-metylfenyl)ureido)toluen		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-metylbenzoyl)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	cyprokonazol (ISO) $\alpha$ -(1-cyklopropyletyl)- $\alpha$ -(4-klorfenyl)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol		—	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		



## BILAGA 2

**R 66**

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

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den DE versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

(Berör inte den SV versionen)

---

## BILAGA 3A

**S 23**

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

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den DE versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

(Berör inte den SV versionen)

**S 26**

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

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

(Berör inte den SV versionen)

**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.

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

(Berör inte den SV versionen)

—

## BILAGA 3B

**S 27/28**

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

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

(Berör inte den SV versionen)

**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 samlingsställe för farligt avfall.

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

—

## BILAGA 4A

**"B.10. MUTAGENICITET – TEST IN VITRO AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR****1. METOD**

DENNA METOD ÄR EN KOPIA AV METODEN OECD TG 473, Test *In Vitro* av kromosomavvikelser hos däggdjur (1997).

**1.1 INLEDNING**

Avsikten med testen av kromosomavvikelser *in vitro* är att identifiera ämnen som orsakar strukturella kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller (1) (2) (3). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. En ökning av polyploidin kan indikera att ett kemiskt ämne har potential att inducera numeriska avvikelser. Denna metod är dock inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för det ändamålet. Kromosommutationer och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar och det finns påtagliga bevis för att kromosommutationer och liknande händelser som ger upphov till förändringar i onkogener och tumörsuppressorgener i somatiska celler är inblandade i cancerinduktion hos människa och hos försöksdjur.

Test av kromosomavvikelser *in vitro* kan göras med kulturer av etablerade cellinjer, cellstammar eller primära cellkulturer. De celler som används väljs ut på grundval av tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet, antalet kromosomer, kromosomernas mångfald och den spontana frekvensen av kromosomavvikelser.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta metaboliska system för aktivering kan inte helt och hållet efterlikna de förhållanden som råder i däggjuret *in vitro*. Man bör se till att undvika sådana förhållanden som skulle leda till positiva resultat som inte återspeglar den verkliga mutageniciteten och kan ha sin orsak i pH-förändringar, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (4) (5).

Denna test används för att söka efter möjliga mutagener och karcinogener hos däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena hos däggdjur, men det finns ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt starkare bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med detta test, eftersom det ser ut som om de verkar genom andra mekanismer än direkta DNA-skador.

Se även Allmän inledning, del B.

**1.2 DEFINITIONER**

*avvikelser av kromatidtyp*: en strukturell kromosomskada, uttryckt i form av brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

*avvikelser av kromosomtyp*: en strukturell kromosomskada, uttryckt som brott, eller brott och återförening, hos båda kromatiderna på samma ställe.

*endoreduplikation*: en process där kärnan efter den S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

*lucka*: en akromatisk skada som är mindre än bredden hos en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

*mitotiskt index*: den andel celler som är i metafase delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av tillväxt hos den populationen.

*numerisk avvikelse*: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

*polyploidi*: en multipel av det haploida antalet kromosomer ( $n$ ) som skiljer sig från det diploida antalet (dvs.  $3n$ ,  $4n$  och så vidare).

*strukturell avvikelse*: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

### 1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Cellodlingar exponeras för testsubstansen både med och utan metabolisk aktivering. Vid förutbestämda intervall, efter att cellodlingen har exponerats för testsubstansen, utförs behandling med ett ämne som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. Colcemid<sup>®</sup> eller colchicin). Därefter skördas cellerna och färgas in, varpå närvaro av kromosomavvikelser i metafascellerna analyseras mikroskopiskt.

### 1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

#### 1.4.1 Förberedelser

##### 1.4.1.1 Celler

Ett antal olika cellinjer, stammar eller primära cellkulturer, inklusive humanceller, kan användas (t.ex. fibroblaster från kinesisk hamster, perifera blodlymfocyter från människor eller andra däggdjur).

##### 1.4.1.2 Typ av medium och kultur

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, CO<sub>2</sub>-koncentration, temperatur och luftfuktighet) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinemässigt kontrolleras med avseende på stabilitet hos det modala kromosomantalet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma. Om kontaminering har skett bör de inte användas. Cellernas normala cellcykeltid och de odlingsförhållanden som används bör vara kända.

##### 1.4.1.3 Förberedelse av kulturer

Etablerade cellinjer och stammar: celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att kulturerna inte kommer att växa samman innan det är dags att skörda, och inkuberas vid 37°C.

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin) eller separerade lymfocyter som erhållits från friska individer, tillsätts till odlingsmediet, vilket innehåller en mitogen substans (t.ex. fytohemaglutinin), varpå inkubering sker vid 37°C.

##### 1.4.1.4 Metabolisk aktivering

Celler bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt metaboliskt system för aktivering. Det mest använda systemet är en kofaktorstött post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) eller en blandning av fenobarbiton och  $\beta$ -naftoflavon (10) (11) (12).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1 till 10% v/v i det slutliga testmediet. Tillståndet hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den post-mitokondriella fraktionen.

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive skapandet av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan erbjuda en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som skall användas bör vara vetenskapligt underbyggt (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen hos testsubstansen).

#### 1.4.1.5 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanter bör lösas upp i eller blandas med lämpligt lösningsmedel eller vehikel och spådas ut om detta är lämpligt före det att cellerna behandlas. Flytande testsubstanter kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spådas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata påvisar att lagring är acceptabelt.

#### 1.4.2 **Försöksbetingelser**

##### 1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom tillsats av en molekylsikt.

##### 1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som skall övervägas när den högsta koncentrationen skall fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas, såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperiment, med hjälp av en lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom graden av sammanväxning, viabilitetsräkning av cellerna, eller ett mitotiskt index. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

Minst tre analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och  $\sqrt{10}$ . Vid tiden för skörd av cellerna bör den högsta koncentrationen visa en signifikant reduktion i graden av konfluens, cellräkning eller mitotiskt index (alla större än 50%). Det mitotiska indexet är endast ett indirekt mått på cytotoxiska/cytostatiska effekter och är beroende av tiden efter behandlingen. Det mitotiska indexet är dock acceptabelt för suspensionskulturer där andra toxicitetsmätningar kan vara besvärliga och opraktiska. Information om kinetiken för cellcykler, såsom medelgenerationstid (AGT), kan användas som extra information. AGT är dock ett övergripande medelvärde som inte alltid avslöjar existensen av försenade subpopulationer, och även små ökningar av medelgenerationstiden kan associeras med en mycket påtaglig senareläggning av tiden för optimalt utbyte av avvikelser.

För substanser som är relativt icke-cytotoxiska bör den maximala testkoncentrationen vara 5  $\mu\text{l/ml}$ , 5 mg/ml eller 0,01 M, beroende på vilket av dessa värden som är det lägsta.

För relativt olösliga substanser, som inte är toxiska vid koncentrationer som är lägre än koncentrationen där olöslighet inträder, bör den högsta använda dosen vara en koncentration som ligger över löslighetsgränsen i det avslutande odlingsmediet mot slutet av behandlingsperioden. I vissa fall (t.ex. när toxicitet endast uppträder vid koncentrationer som är högre än den lägsta olösliga koncentrationen) är det lämpligt att testa vid mer än en koncentration med synlig fällning. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid början och slutet av behandlingen, eftersom lösligheten kan ändras under det att exponeringen i testsystemet pågår, beroende på närvaro av celler, S9, serum, etc. Löslighet kan detekteras med blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

##### 1.4.2.3 *Negativa och positiva kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av en sådan typ att aktivering krävs för att ge ett mutagent svar.

Positiva kontroller bör utnyttja en känd klastogen vid exponeringsnivåer som förväntas ge en reproducerbar och detekterbar ökning jämfört med bakgrunden och som demonstrerar känsligheten hos testsystemet.

Positiva kontrollkoncentrationer bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanter.

Betingelser för metabolisk aktivering	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Frånvaro av exogen metabolit Aktivering	Metylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Etylnitrosoarea	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Närvaro av exogen metabolit Aktivering	Bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyklofosamid	50-18-0	200-015-4
	Cyklofosamidmonohydrat	6055-19-2	

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanter kan användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av lösningsmedel eller enbart en vehikel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas var gång som odlingen skördas. Dessutom bör obehandlade kontroller också användas om det inte finns historiska kontrolldata som påvisar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

### 1.4.3 Förfarande

#### 1.4.3.1 *Behandling med en testsubstans*

Prolifererande celler behandlas med testsubstansen i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Behandling av lymfocyter bör inledas när cirka 48 timmar gått efter den mitogena stimuleringen.

#### 1.4.3.2 Två kulturer bör normalt användas för varje koncentration, och rekommenderas varmt för negativa kontrollkulturer eller kontrollkulturer för lösningsmedel. Där minimala variationer mellan två kulturer kan påvisas (13) (14) ur historiska data, kan det vara acceptabelt att en enda kultur används för varje koncentration.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, t.ex. test i slutna odlingskärl (15) (16).

#### 1.4.3.3 *Tid för skörd av odlingen*

I det första experimentet bör cellerna exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (12). Om detta protokoll ger negativa resultat både med och utan aktivering, bör ytterligare ett experiment utan aktivering utföras, med kontinuerlig behandling fram till att provtagning sker vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd. Vissa kemikalier kan vara enklare att detektera vid behandlings-/provtagningstider som är längre än 1,5 cykellängder. Negativa resultat med metabolisk aktivering måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta motiveras.

#### 1.4.3.4 Kromosomberedning

Cellkulturer behandlas vanligtvis med Colcemid® eller colchicin under 1–3 timmar innan skördning sker. Varje cellkultur skördas och behandlas separat för preparationen av kromosomer. Kromosomberedning innefattar hypoton behandling av cellerna, fixering och infärgning.

#### 1.4.3.5 Analys

Alla utstryksglas, inklusive de med positiva och negativa kontroller, bör kodas upp oberoende av varandra innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringen ofta ger upphov till brott på en del av de celler som är i metafase, med åtföljande förlust av kromosomer, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal som är ekvivalent med det modala antalet  $\pm 2$  för alla celltyper. Åtminstone 200 väl spridda metafaser bör förekomma per koncentration och kontroll, med lika fördelning mellan dubbelproven, om det är tillämpligt. Detta antal kan reduceras när ett stort antal avvikelser observeras.

Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera polyploiditet och endoreduplikation när dessa händelser observeras.

## 2. DATA

### 2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Den experimentella enheten utgörs av cellen, och därför bör den procentandel av cellerna som uppvisar strukturella kromosomavvikelser utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för experimentella kulturer samt kontrollkulturer. Luckor i DNA-strängen noteras separat och rapporteras men inkluderas inte generellt i den totala frekvensen för avvikelser.

Samtidiga mätningar av cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollkulturer i huvudexperimenten avseende avvikelser bör även samlas in.

Individuella data för kulturen bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanställas i form av en tabell.

### 2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning av antalet celler med kromosomavvikelser. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärderingen av testresultaten (3) (13). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

En ökning av antalet polyploida celler kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelser. En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera cellcykelns förlopp (17) (18).

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier bedöms såsom icke-mutagen i detta system.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många experiment som utförs.



Positiva resultat från testet av kromosomavvikelse *in vitro* indikerar att testsubstanten inducerar strukturella kromosomavvikelse hos odlade somatiska däggdjursceller. Negativa resultat indikerar att testsubstanten inte inducerar kromosomavvikelse hos odlade somatiska däggdjursceller under de betingelser som rådde under testet.

### 3. **RAPPORTERING**

#### TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering av valet av vehikel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Celler:

- cellernas typ och ursprung
- den använda celltypens karyotypegenskaper och lämplighet
- frånvaro av mykoplasma, om detta är tillämpligt
- information om cellcykelns längd
- bloddonatorernas kön, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans antal passager, om detta är tillämpligt
- metoder för underhåll av cellkulturen, om detta är tillämpligt
- det normala antalet kromosomer

Försöksbetingelser:

- identitet hos det ämne som stoppar celledelningen i metafasen, dess koncentration och cellexponeringens varaktighet
- grund för val av koncentrationer och antalet kulturer som ingår, t.ex. data för cytotoxicitet och begränsningar i löslighet, om detta finns tillgängligt
- mediets sammansättning, CO<sub>2</sub>-koncentration, om detta är tillämpligt
- testsubstansens koncentration
- den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym
- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varaktighet
- celldensitet vid inokulering, om detta är tillämpligt
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier
- positiva och negativa kontroller
- metoder för preparation av utstryksglas
- kriterier för bedömning av avvikelser

- antal metafaser som analyserats
- metoder för toxicitetsmätningarna
- kriterier för när studierna skall anses vara positiva, negativa eller osäkra

#### Resultat:

- tecken på toxicitet, t.ex. grad av sammanväxning, cellcykeldata, cellräkningar, mitotiskt index
- tecken på utfällning
- data om behandlingsmediets pH och osmolalitet, om detta har uppmätts
- definition av avvikelser, inklusive luckor i DNA-strängen
- antalet celler med kromosomavvikelser och typ av sådana avvikelser, angivna separat för varje behandlad kultur samt kontrollkultur
- förändringar i ploiditet, om detta observerats
- dos/respons-förhållande, där det är möjligt
- statistiska analyser, om sådana finns
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata
- historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med variationer, medelvärden och standardavvikelser

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

#### 4. REFERENSER

- (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, s. 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, s. 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., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), s. 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, s. 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, s. 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, s. 347-364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, s. 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*, I. 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, s. 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, s. 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, s. 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., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds) *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, s. 85-88.
  - (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 91-103.
  - (16) Zamora, P. O., Beson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels of Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, s. 795-801.
  - (17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, s. 403-413.
  - (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, s. 1362-1364."
-

## BILAGA 4B

**"B.11. MUTAGENICITET – TEST IN VIVO AV KROMOSOMAVVIKELSER I BENMÄRG HOS DÄGGDJUR****1. METOD**

Denna metod är en kopia av OECD TG 475, Test av kromosomavvikelser i benmärg hos däggdjur (Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997)).

**1.1 INLEDNING**

Testet *in vivo* avseende kromosomavvikelser hos däggdjur används för att detektera strukturella kromosomavvikelser inducerade av testsubstansen i benmärgsceller hos djur, vanligen hos gnagare (1) (2) (3) (4). Strukturella kromosomavvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. En ökning av polyploidin kan indikera att en kemikalie har potential att inducera numeriska avvikelser. För huvuddelen av de kemiska mutagenerna utgörs de inducerade avvikelserna av kromatidtypen, men även avvikelser av kromosomtyp kan förekomma. Kromosommutationer och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människa och det finns omfattande bevis för att kromosommutationer och liknande händelser som ger upphov till förändringar i onkogener samt att tumörsuppressorgener är inblandade i cancer hos människa och i experimentella system.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Benmärg är målvävnaden i detta test, eftersom det är en mycket kärlik vävnad som innehåller en cellpopulation med en snabb cellcykel, och där cellerna enkelt kan isoleras och bearbetas. Andra arter och målvävnader används inte med denna metod.

Detta test av kromosomavvikelser är särskilt relevant för att fastställa mutagena risker, eftersom det medger överväganden av faktorer *in vivo* för metabolism, farmakokinetik och processer för DNA-reparationer, även om dessa faktorer kan variera mellan olika arter och vävnader. Ett test *in vivo* är även användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt, med detektion genom tester *in vitro*.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

**1.2 DEFINITIONER**

*avvikelse av kromatidtyp*: en strukturell kromosomskada, uttryckt i form av brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

*avvikelse av kromosomtyp*: en strukturell kromosomskada, uttryckt som brott, eller brott och återförening, hos båda kromatiderna på samma ställe.

*endoreduplikation*: en process där kärnan efter den S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

*lucka*: en akromatisk skada som är mindre än bredden hos en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

*numerisk avvikelse*: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

*polyploid*: en multipel av det haploida antalet kromosomer ( $n$ ) som skiljer sig från det diploida antalet (dvs.  $3n$ ,  $4n$ ).

*Strukturell avvikelse*: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafase stadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

### 1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Djur exponeras för testsubstansen genom en lämplig metod för exponering och de avlivas på lämpliga tider efter behandlingen. Innan de avlivas behandlas djuren med ett ämne som gör att celler stannar upp i metafase (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosomberedningar görs sedan från benmärgscellerna och färgas in, varpå celler i metafase analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

### 1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

#### 1.4.1 Förberedelser

##### 1.4.1.1 Val av djurarter

Vanligen används råttor, möss och kinesiska hamstrar, även om vilket lämpligt däggdjur som helst kan utnyttjas. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen skall påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga  $\pm 20\%$  av medelvikten för varje kön.

##### 1.4.1.2 Förhållanden vid förvaring och utfodring

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60%.

##### 1.4.1.3 Förberedelse av djuren

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar.

##### 1.4.1.4 Beredning av doser

Fasta testsubstanter bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanter i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

#### 1.4.2 Försöksbetingelser

##### 1.4.2.1 Lösningssmedel/vehikel

Lösningssmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningssmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningssmedel/vehiklar.

##### 1.4.2.2 Kontroller

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningssmedel/vehikel) bör ingå för varje kön i varje test. Förutom behandling med testsubstansen, bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör ge strukturella avvikelser *in vivo* vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden. Positiva kontrolldosor bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att identiteten hos kodade utstryksglas inte omedelbart avslöjas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagning endast

sker vid ett enstaka tillfälle. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier kan dessutom övervägas när dessa finns tillgängliga. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanter.

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyklofosamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosamidmonohydrat	6055-19-2	
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade enbart med lösningsmedel eller vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens hos celler med kromosomavvikelse hos djuren kan erhållas från historiska kontrolldata. Om enstaka provtagning används för negativa kontroller, är den lämpligast tiden det första provtagningstillfället. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas om det inte finns historiska eller publicerade kontroll-data som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

## 1.5 FÖRFARANDE

### 1.5.1 Försöksdjurens antal och kön

Varje behandlad grupp samt kontrollgruppen måste bestå av minst 5 analyserbara djur av varje kön. Det räcker med att testa enbart det ena könet, om det vid tiden för undersökningens genomförande finns data tillgängliga från undersökningar av samma art och där man har använt sig av samma exponeringsätt, så att det går att visa att det inte finns några substantiella skillnader i toxicitet mellan könen. I de fall där exponering för kemikalier hos människa kan vara könsspecifik, vilket t.ex. kan vara fallet för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

### 1.5.2 Behandlingschema

Testsubstanter administreras med fördel som en enstaka behandling. Testsubstanter kan även administreras i form av en delad dos, två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av en stor volym. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

Prover bör tas vid två separata tillfällen efter behandling under en dag. Det första provtagningstillfället för gnagare ligger på 1,5 gånger den normala cellcykelns längd (den senare är normalt 12–18 timmar) efter behandling. Eftersom den tid som går åt för upptag och metabolism av testsubstansen, likväl som dess effekt på cellcykelns kinetik, kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelse, så rekommenderas att provtagningen senareläggs till 24 timmar efter det första provtagningstillfället. Om doseringsscheman på mer än en dag används, bör man använda en provtagningstid på 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter den slutliga behandlingen.

Innan djuren avlivas bör de injiceras intraperitonealt med en lämplig dos av ett ämne som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Prov på försöksdjur bör därefter tas vid lämpliga intervall. För möss är detta intervall ca 3–4 timmar; för kinesiska hamstrar ligger intervallet på ca 4–5 timmar. Celler skördas från benmärgen och analyseras med avseende på kromosomavvikelse.

### 1.5.3 Dosnivåer

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare skall användas i huvudundersökningen (5). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett område som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör. Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas från fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i benmärgen (t.ex. mer än 50% reduktion av mitotiskt index).

### 1.5.4 'Limit-test'

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå på minst 2000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. För undersökningar med en längre varaktighet ligger gränsdosen på 2000 mg/kg/kroppsvikt/dag vid behandlingar upp till 14 dagar, och 1000 mg/kg/kroppsvikt/dag för behandlingar som varar längre än 14 dagar. Förväntad exponering av människor kan utgöra en indikation på behovet av att använda en högre dosnivå i ett 'limit-test'.

### 1.5.5 Administrering av doser

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra vägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100g kroppsvikt. Användning av volymer som är högre än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

### 1.5.6 Kromosomberedning

Omedelbart efter avlivningen tas benmärgen ut, tillsätts hypoton lösning och fixeras. Cellerna sprids sedan ut på utstryksglas och färgas in.

### 1.5.7 Analys

Det mitotiska indexet bör fastställas om ett mått på cytotoxicitet hos minst 1000 celler per djur för alla behandlade försöksdjur (inklusive positiva kontroller) och obehandlade försöksdjur för negativ kontroll.

Minst 100 celler bör analyseras för varje försöksdjur. Detta antal kan reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de för positiva och negativa kontroller, bör koderas oberoende av varandra innan de analyseras i mikroskop. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafase med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal som är lika med antalet  $2n \pm 2$ .

## 2. DATA

### 2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data för försöksdjuren bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av djuret. För varje försöksdjur bör antalet celler som påträffas, antalet avvikelser per cell och procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelser utvärderas. Antalet och frekvensen av olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen noteras separat och rapporteras men inkluderas inte generellt i den totala frekvensen av avvikelser. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data från båda könen kombineras för statistisk analys.

## 2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning i det relativa antalet celler med kromosomavvikelse eller en tydlig ökning av antalet celler som uppvisar avvikelser i en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultatet (6). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt. Tvetydiga resultat bör klargöras genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En ökning av polyploidin kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inducera numeriska kromosomavvikelse. En ökning av endoreduplikationen kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera cellcykelns förlopp (7) (8).

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppställningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många experiment som utförs.

Positiva resultat från testet av kromosomavvikelse *in vitro*, indikerar att en substans inducerar kromosomavvikelse i benmärgen hos de arter som testades. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under dessa försöksbetingelser, inte inducerar kromosomavvikelse i benmärgen hos de arter som testades.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når ut till det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

## 3. RAPPORTERING

### TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

#### Lösningsmedel/vehikel:

- motivering av valet av vehikel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

#### Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal, ålder och kön
- källa, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

#### Försöksbetingelser:

- positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel)
- data från en undersökning av lämpligt intervall, om en sådan har utförts
- grund för valet av dosnivå
- uppgifter om beredningen av testsubstansen



- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för administreringens tillförselväg
- metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämpligt
- omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg/kroppsvikt/dag), om detta är tillämpligt
- uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman
- metoder för mätningar av toxicitet
- identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafase, deras koncentration och behandlingens varaktighet
- metoder för preparation av utstryksglas
- kriterier för hur avvikelser påvisas
- antalet celler som analyserats per försöksdjur
- kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

- tecken på toxicitet
- mitotiskt index
- typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur
- det totala antalet avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser
- antal celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser
- förändringar i ploiditet, om några sådana har observerats
- dos/respons-förhållande, där så är möjligt
- statistiska analyser, om några sådana förekommer
- samtidiga negativa kontrolldata
- historiska negativa kontrolldata med områden, medelvärden och standardavvikelser
- samtidiga positiva kontrolldata

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

#### 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., s. 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, s. 157–165.

- (3) Richold, M., Chandley, 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 York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.
  - (4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H. Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Simada, 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, s. 305–312.
  - (5) 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, s. 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. s. 184–232.
  - (7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, s. 403–413.
  - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, s. 1362–1364.”
-

## BILAGA 4C

**"B.12. MUTAGENICITET – TEST AV MIKROKÄRNOR *IN VIVO* I ERYTROCYTER HOS DÄGGDJUR****1. METOD**

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 474, Test av mikrokärnor i erythrocyter hos däggdjur (Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997)).

**1.1. INLEDNING**

Testet av mikrokärnor *in vivo* hos däggdjur används för detektion av sådana skador på kromosomer eller på den mitotiska apparaten hos erytroblastar som induceras av testsubstansen, genom analys av erythrocyter från provtagning på benmärg och/eller perifert blod från djurceller, vanligtvis gnagare.

Avsikten med testet av mikrokärnor är att identifiera substanser som orsakar cytogen skada, vilket resulterar i bildning av mikrokärnor som innehåller isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

När en erytroblast från benmärg utvecklas till en polykromatisk erythrocyt stöts huvudkärnan ut. Varje mikrokärna som har bildats kan bli kvar i den annars kärnfria cytoplasman. Visualisering av mikrokärnor underlättas i dessa celler eftersom de saknar en huvudkärna. En ökning av frekvensen av polykromatiska erythrocyter med mikrokärnor hos behandlade försöksdjur utgör en indikation på inducerade kromosomskador.

Benmärg från gnagare används rutinmässigt i detta test eftersom polykromatiska erythrocyter produceras i sådan vävnad. Mätningen av omogna (polykromatiska) erythrocyter med mikrokärnor i perifert blod är lika acceptabelt hos alla arter där oförmågan hos mjälten att avlägsna erythrocyter med mikrokärnor har kunnat påvisas, eller som har uppvisat en adekvat sensitivitet för att detektera ämnen som orsakar strukturella eller numeriska kromosomavvikelser. Mikrokärnor kan särskiljas genom ett antal olika kriterier. Dessa innefattar identifiering av närvaron eller frånvaron av en kinetochor eller av centromer-DNA i mikrokärnor. Frekvensen av omogna (polykromatiska) erythrocyter med mikrokärnor utgör den huvudsakliga slutpunkten. Antalet mogna (normokromatiska) erythrocyter i perifert blod som innehåller mikrokärnor bland ett givet antal mogna erythrocyter kan även användas som slutpunkt på undersökningen, när försöksdjur behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller längre.

Detta test av mikrokärnor *in vivo* på däggdjur är särskilt relevant för att fastställa mutagena risker, eftersom det möjliggör överväganden av faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och processer för DNA-reparationer, även om sådana faktorer kan variera mellan olika arter, vävnader och genetiska slutpunkter. Ett test *in vivo* är även användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt, med detektion i ett *in vitro*-system.

Om det finns bevis för att testsubstansen eller en reaktiv metabolit inte kommer att nå målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

**1.2. DEFINITIONER**

*centromer (Kinetochor)*: Delar av en kromosom till vilka spindelfibrer är fästa under celledelning, vilket ger upphov till en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

*mikrokärnor*: Små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna, och som produceras under mitosens telofas (meios) från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

*normokromatisk erythrocyt*: Mogna erythrocyter som saknar ribosomer och som kan särskiljas från omogna polykromatiska erythrocyter genom infärgning som är selektiv för ribosomer.

*polykromatisk erythrocyt*: Omogen erythrocyt, i ett intermediärt utvecklingsstadium, vilken fortfarande innehåller ribosomer och därför kan särskiljas från mogna, normokromatiska erythrocyter genom infärgning som är selektiv för ribosomer.

### 1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur bör exponeras för testsubstansen på ett lämpligt sätt. Om benmärg används, bör försöksdjuren avlivas vid lämpliga tider efter behandling, varvid benmärg extraheras, preparationer görs och färgas in (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). När perifert blod används, samlas blodet upp vid lämpliga tidpunkter efter behandling och utstrykspreparationer görs, vilka sedan färgas in (4) (8) (9) (10). Vid undersökningar med perifert blod, bör det gå så kort tid som möjligt mellan den sista exponeringen och skörden av cellerna. Preparationerna analyseras med avseende på närvaron av mikrokärnor.

### 1.4. BESKRIVNING AV TESTMETODEN

#### 1.4.1. Förberedelser

##### 1.4.1.1. Val av djurarter

Råttor, möss och kinesiska hamstrar används vanligen, även om vilket lämpligt däggdjur som helst kan användas. Vid användning av perifert blod rekommenderas möss. Det är emellertid även möjligt att använda andra däggdjursarter, förutsatt att det är en art där mjälten inte avlägsnar erythrocyter med mikrokärnor eller en art som har uppvisat en adekvat känslighet när det gäller att detektera ämnen som kan orsaka strukturella eller numeriska kromosomavvikelser. Vanligt använda laboratoriestammar av unga, friska försöksdjur bör komma i fråga. Vid undersökningens början bör viktskillnaden mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida  $\pm 20\%$  av medelvikten för varje kön.

##### 1.4.1.2. Förhållanden vid förvaring och utfodring

De generella förhållanden som anges i den allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60%.

##### 1.4.1.3. Förberedelse av djuren

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar.

##### 1.4.1.4. Beredning av doser

Fasta testsubstanter bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanter i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

#### 1.4.2. Försöksbetingelser

##### 1.4.2.1. Lösningsmedel/vehikel

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Det rekommenderas att, därhelst det är möjligt, man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

##### 1.4.2.2. Kontroller

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå för varje test. Förutom behandling med testsubstansen, bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör ge mikrokärnor *in vivo* vid de exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden. Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga, men att identiteten hos kodade utstryksglas inte omedelbart avslöjas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagning endast sker vid ett enstaka tillfälle. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier kan dessutom övervägas när dessa finns tillgängliga. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etyl-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
Trietylmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade enbart med lösningsmedel eller vehiklar, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningsstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens hos celler med kromosomavvikelser hos djuren kan erhållas ur historiska kontrolldata. Om enstaka provtagningar används för negativa kontroller, är den lämpligaste tiden det första provtagningsstillfallet. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas om det inte finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

Om perifert blod används, kan även ett prov taget innan behandlingen påbörjas vara acceptabelt som en samtidig negativ kontroll, men endast för de korta perifera undersökningarna av blod (t.ex. 1–3 behandling(ar)) när resulterande data ligger inom det förväntade området för den historiska kontrollen.

## 1.5. FÖRFARANDE

### 1.5.1. Försöksdjurens antal och kön

Varje behandlad grupp samt kontrollgruppen måste bestå av minst 5 analyserbara djur av varje kön. Det räcker med att testa enbart det ena könet, om det vid tiden för undersökningens genomförande finns data tillgängliga från undersökningar av samma art och där man har använt sig av samma exponeringssätt, så att det går att visa att det inte finns några substansiella skillnader i toxicitet mellan könen. I de fall där exponering för kemikalier hos människa kan vara könsspecifik, vilket t.ex. kan vara fallet för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

### 1.5.2. Behandlingsschema

Inget standardiserat behandlingsschema (t.ex. en, två eller flera behandlingar med 24 timmars intervall) kan rekommenderas. Proverna från utökade doseringsscheman är acceptabla så länge som en positiv effekt har demonstrerats för denna typ av undersökning eller, för en negativ undersökning, så länge som toxicitet har påvisats eller gränsvärdesdosen har använts, och doseringen fortsatte tills det var dags för provtagning. Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, dvs. två behandlingar under en och samma dag med högst några timmars intervall, för att på så sätt underlätta administrering av stora volymer med material.

Testet kan utföras på två sätt

- Försöksdjur behandlas en gång med testsubstansen. Prover på benmärg tas ut minst två gånger, med början tidigast 24 timmar och senast 48 timmar efter behandling, och med lämpliga intervall mellan proven. Om prover tas tidigare än 24 timmar efter behandling bör detta motiveras. Prover på perifert blod tas ut

minst två gånger, med början tidigast 36 timmar efter behandling, och i lämpliga intervall efter det första provet, men inte senare än efter 72 timmar. När ett positivt svar identifieras vid ett provtagningstillfälle, så är ytterligare provtagning inte nödvändig.

- b) Om två eller flera dagliga behandlingar utförs (t.ex. två eller flera behandlingar med 24 timmars intervall), bör prover tas ut en gång mellan 18 och 24 timmar efter den slutliga behandlingen av benmärgen och en gång mellan 36 och 48 timmar efter den slutliga behandlingen av det perifera blodet (12).

Prover kan dessutom tas vid andra tidpunkter när detta är lämpligt.

#### 1.5.3. **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare skall användas i huvudundersökningen (13). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett område som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör. Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas från fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i benmärgen (t.ex. en reduktion av andelen omogna erythrocyter jämfört med det totala antalet erythrocyter i benmärgen eller i perifert blod).

#### 1.5.4. **'Limit-test'**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. För undersökningar med en längre varaktighet ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag vid behandlingar upp till 14 dagar, och på 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för behandlingar som varar längre än 14 dagar. Förväntad exponering av människor kan utgöra en indikation på behovet av att använda en högre dosnivå i ett 'limit-test'

#### 1.5.5. **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är högre än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

#### 1.5.6. **Beredning av benmärg/blod**

Benmärgsceller erhålls vanligen från lårbenet eller skenbenet omedelbart efter det att djuret avlivats. Normalt avlägsnas cellerna från lårbenet eller skenbenet, prepareras och färgas in med hjälp av etablerade metoder. Perifert blod erhålls från svansvenen eller någon annan lämplig blodåder. Blodceller färgas omedelbart in supravitalt (8) (9) (10) eller så görs utstrykspreparationer vilka sedan färgas in. Användningen av ett DNA-specifikt färgämne (t.ex. akridinorange (14) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) kan eliminera några av de artefakter som är associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Denna fördel utsluter inte användningen av konventionella färgämnen (t.ex. Giemsa). Ytterligare system (t.ex. cellulosa-kolonner för att avlägsna celler med kärnor (16)) kan även användas, förutsatt att dessa system har visat sig fungera på ett adekvat sätt vid preparation av mikrokärnor i laboratoriet.

#### 1.5.7. **Analys**

Andelen omogna erythrocyter bland det totala antalet erythrocyter (omogna + mogna) bestäms för varje djur genom att totalt räkna minst 200 erythrocyter för benmärg och 1 000 erythrocyter för perifert blod (17). Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning innan analys i

mikroskop utförs. Minst 2 000 omogna erythrocyter per djur undersöks med avseende på förekomst av omogna erythrocyter med mikrokärnor. Ytterligare information kan erhållas genom att söka efter mogna erythrocyter med mikrokärnor. Vid analys av utstryksglas bör antalet omogna erythrocyter jämfört med det totala antalet erythrocyter inte vara mindre än 20% av kontrollvärdet. När djur behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller mer kan även minst 2 000 mogna erythrocyter per djur undersökas med avseende på förekomst av mikrokärnor. System för automatiserad analys (bildanalys och flödescytometri av celluspensioner) är acceptabla alternativ till manuell utvärdering om lämplig verifiering och validering sker.

## 2. DATA

### 2.1. BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. Antalet omogna erythrocyter som påträffas, antalet omogna erythrocyter med mikrokärnor, och antalet omogna bland det totala antalet erythrocyter bör listas separat för varje djur som analyseras. När försöksdjur behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller mer, bör data över mogna erythrocyter också presenteras, om dessa har samlats in. Andelen omogna erythrocyter bland det totala antalet erythrocyter och, om det anses tillämpligt, procentandelen av erythrocyter med mikrokärnor, bör anges för varje försöksdjur. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data från båda könen kombineras för statistisk analys.

### 2.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av antalet celler med mikrokärnor eller en tydlig ökning av antalet celler med mikrokärnor hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (18) (19). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Aven om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat i testet av mikrokärnor tyder på att substansen inducerar mikrokärnor som är ett resultat av en kromosomal skada eller skada på den mitotiska apparaten i erytroblasterna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under dessa försöksbetingelser, inte ger upphov till mikrokärnor i de omogna erythrocyterna hos den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller någon av dess metaboliter skall nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

## 3. RAPPORTERING

### TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering för valet av vehikel
- testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

## Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal, ålder och kön
- källa, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

## Försöksbetingelser:

- positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel)
- data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts
- grund för valet av dosnivå
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för det sätt administreringen sker på
- metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämpligt
- omvandling av koncentrationen för testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg/kroppsvikt/dag), om detta är tillämpligt
- fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningscheman
- metoder för preparation av utstryksglas
- metoder för mätningar av toxicitet
- kriterier för bestämning av omogna erythrocyter med mikrokärnor
- antalet analyserade celler per djur
- kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

## Resultat:

- tecken på toxicitet
- andelen omogna erythrocyter av det totala antalet erythrocyter
- antalet omogna erythrocyter med mikrokärnor, angett separat för varje djur
- medelvärde  $\pm$  standardavvikelse för omogna erythrocyter med mikrokärnor per grupp
- dos/respons-förhållande, närhelst detta är möjligt
- statistiska analyser och metoder som används
- samtidiga och historiska negativa kontrolldata
- samtidiga positiva kontrolldata

## Diskussion av resultaten.

## Slutsatser.



## 4. REFERENSER

- (1) Heddle, J. A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, s. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975). The micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, s. 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, s. 61-118.
- (4) Mavourmin, 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, s. 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, s. 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: s. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Selby, 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of  $30 \pm 6$  h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, s. 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, s. 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, s. 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, s. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.* 213, s. 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, s. 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, Sydney, s. 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, s. 184-232."

## BILAGA 4D

## "B.13/14. MUTAGENICITET – TEST AV ÅTERMUTATION HOS BAKTERIER

## 1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 471, Omvänt bakteriellt mutationstest (Bacterial Reverse Mutation Test (1997)).

## 1.1 INLEDNING

I detta test av återmutation hos bakterier används aminosyraberoende stammar av *Salmonella typhimurium* och *Escherichia coli* för att detektera punktmutationer, vilka innefattar substitution, addition eller deletion av ett eller några DNA-baspar (1) (2) (3). Testet bygger på principen att man detekterar mutationer som gör att redan existerande mutationer i teststammarna går tillbaka varvid den funktionella förmågan hos bakterierna att syntetisera en essentiell aminosyra återställs. De återmuterade bakterierna detekteras på grundval av sin förmåga att växa i frånvaro av den aminosyra som krävs hos den ursprungliga teststammen.

Punktmutationer är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor och mycket tyder på att punktmutationer i onkogener och suppressorgener för tumörer i somatiska celler är inblandade i bildning av tumörer hos människor och försöksdjur. Testet av återmutation hos bakterier är snabbt, billigt och relativt enkelt att utföra. Många av testarterna har ett flertal egenskaper som gör dem mera känsliga för detektion av mutationer inklusive responsiva DNA-sekvenser vid reversionssäten, ökad cellerpermeabilitet för stora molekyler och eliminering av reparationssystem för DNA eller förstärkning av felbenägna reparationsprocesser för DNA. Specificiteten hos teststammarna kan erbjuda en del nyttig information om de typer av mutationer som induceras av genotoxiska ämnen. En mycket stor databas med resultat för ett stort antal olika strukturer finns tillgänglig för tester av återmutation hos bakterier och väletablerade metoder har utvecklats för testning av kemikalier med olika fysisk-kemiska egenskaper, inklusive flyktiga ämnen.

Se även Allmän inledning, del B.

## 1.2 DEFINITIONER

ett test av återmutation hos antingen *Salmonella typhimurium* eller *Escherichia coli* detekterar mutation i en aminosyraberoende stam (histidin respektive tryptofan) vilket ger en stam som är oberoende av en extern tillförsel av aminosyror.

mutagener som ger basparssubstitutioner är ämnen som orsakar en basförändring i DNA. I ett test av återmutation kan denna förändring uppträda vid sätet för den ursprungliga mutationen eller på ett andra säte i det bakteriella genomet.

mutagener som ger förskjutningar (frameshift) är ämnen som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA, vilket då ger en ändrad avläsningsordning i RNA.

## 1.3 INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Testet av återmutation hos bakterier utnyttjar prokaryota celler, vilka skiljer sig från däggdjursceller med avseende på sådana faktorer som upptag, metabolism, kromosomstruktur och processer för DNA-reparation. Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att det finns en yttre källa för metabolisk aktivering. Hos system för metabolisk aktivering *in vitro* kan inte förhållandena för däggdjur *in vivo* efterliknas helt och hållet. Testet ger därför ingen direkt information om den mutagena och den karcinogena potensen hos en substans i däggdjur.

Testet av återmutation hos bakterier används vanligen som en inledande undersökning av genotoxisk aktivitet och, i synnerhet, av aktivitet som inducerar punktmutationer. En omfattande databas har demonstrerat att många kemikalier som ger positiva resultat i detta test även uppvisar mutagen aktivitet i andra tester. Det finns exempel på mutagena ämnen som inte kan detekteras med hjälp av detta test. Skälen till dessa tillkorta-

kommanden kan tillskrivas den specifika naturen hos den detekterade slutpunkten, skillnader i metabolisk aktivering, eller skillnader i biotillgänglighet. Å andra sidan kan faktorer som höjer känsligheten hos testet leda till en överskattning av den mutagena aktiviteten.

Testet av återmutation hos bakterier kan visa sig olämpligt för utvärdering av vissa klasser av kemikalier såsom starkt baktericida ämnen (t.ex. vissa antibiotika) och de som anses (eller är kända för att) interferera specifikt med systemet för cellreplikation hos däggdjur (t.ex. vissa inhibitorer av topoisomeras och vissa nukleosidanaloger). I sådana fall kan mutationstester på däggdjur vara mera lämpliga.

Även om många ämnen som ger positiva resultat i detta test är karcinogena för däggdjur, är korrelationen inte absolut. Den är beroende på kemisk klass och det finns karcinogener som inte kan detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som saknas i bakterieceller.

#### 1.4 TESTMETODENS PRINCIP

Suspensioner med bakterieceller exponeras för testsubstansen i närvaro och i frånvaro av ett exogent system för metabolisk aktivering. I plattinkorporeringsmetoden blandas dessa suspensioner med en toppskiktsagar varpå plattor omedelbart görs på minimalmedium. I preinkubationsmetoden inkuberas behandlingsblandningen och sedan blandas denna med en toppskiktsagar innan plattor görs på minimalmedium. I båda metoderna räknas återmuterade kolonier efter två eller tre dagars inkubering och jämförs med antalet spontant återmuterade kolonier på kontrollplattor med lösningsmedel.

Ett flertal procedurer för att utföra testet av återmutation hos bakterier har beskrivits. Bland de som vanligtvis används ingår plattinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), preinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktueringsmetoden (9) (10) och suspensionsmetoden (11). Modifikationer för testning av gaser eller ångor har tidigare beskrivits (12).

De procedurer som beskrivs i metoden hänför sig primärt till plattinkorporerings- och preinkubationsmetoder. Inga av dem är acceptabla för att genomföra experiment både med och utan metabolisk aktivering. Vissa substanser kan detekteras mer effektivt med hjälp av preinkubationsmetoden. Dessa substanser tillhör kemiska klasser som innefattar korta kedjor med alifatiska nitrosaminer, tvåvärda metaller, aldehyder, azofärger och diazoföreningar, pyrolizidinalkoloider, allylföreningar och nitroföreningar (3). Det är även känt att vissa klasser av mutanter inte alltid detekteras med hjälp av standardprocedurer såsom plattinkorporeringsmetoden eller preinkubationsmetoden. Dessa bör uppfattas som 'speciella fall' och det rekommenderas varmt att alternativa procedurer används för detektionen av dem. De följande 'speciella fallen' bör identifieras (tillsammans med exempel på procedurer som kan användas för detektionen av dem): azofärger och diazoföreningar (3) (5) (6) (13), gaser och flyktiga kemikalier (12) (14) (15) (16) samt glykosider (17) (18). En avvikelse från standardproceduren måste vara vetenskapligt motiverad.

#### 1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

##### 1.5.1 Förberedelser

###### 1.5.1.1 Bakterier

Nya kulturer med bakterier bör få växa till sig fram till den sena exponentiella eller tidiga stationära tillväxtfasen (ungefär  $10^9$  celler per ml). Kulturer som befinner sig i sen stationär fas bör inte användas. Det är viktigt att de kulturer som används i experimentet har en hög titer med livsdugliga bakterier. Titern kan fås fram antingen ur tillväxtkurvor från historiska kontrollerdata, eller ur varje försök genom att bestämma antalet livsdugliga celler med hjälp av ett utstrykningsexperiment.

Den rekommenderade inkubationstemperaturen är 37 °C.

Minst fem bakteriestammar bör användas. Dessa bör inkludera fyra av *S. typhimurium* (TA 1535; Ta 1537 eller TA97a eller TA97; TA98; och TA100) som har visat sig vara tillförlitliga och ge en reproducerbar respons i olika laboratorier. Dessa fyra stammar av *S. typhimurium* har GC-baspar vid det primära återmutationsstället och det är känt att de inte kan detektera vissa oxiderande mutagener, tvärbindande ämnen och hydraziner. Sådana substanser kan detekteras med hjälp av *E. coli* WP2-stammar eller *S. typhimurium* TA 102 (19) som har ett AT-baspar vid det primära återmutationsstället. Den rekommenderade kombinationen av stammar är därför:

- *S. typhimurium* TA 1535,
- *S. typhimurium* TA1537 eller TA97 eller TA97a,
- *S. typhimurium* TA98,
- *S. typhimurium* TA100, och
- *E. coli* WP2 uvrA, eller *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), eller *S. typhimurium* TA102.

Får att kunna detektera tvärbindande mutagener kan det vara lämpligt att inkludera TA102 eller att också använda en DNA-reparationsduglig stam av *E. coli* (t.ex. *E. coli* WP2 eller *E. coli* WP2 (pKM101)).

Etablerade procedurer för beredning av baskulturer, markörverifiering och lagring bör användas. Behovet av aminosyror för tillväxten bör påvisas för varje frusen preparation av baskulturer (histidin för stammar av *S. typhimurium* och tryptofan för stammar av *E. coli*). Andra fenotypiska karakteristika bör kontrolleras på liknande sätt, nämligen närvaron eller frånvaron av R-faktorplasmider där detta är lämpligt (dvs. ampicillin-resistens i stammarna TA98, TA100 och TA97a eller TA97, WP2 uvrA och WP2 uvrA (pKM101) och ampicillin + tetracyklinrestens i stammen TA102); närvaron av karakteristiska mutationer (dvs. rfa-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för kristallviolett och uvrA-mutation i *E. coli* eller uvrB-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för ultraviolett ljus) (2) (3). Stammarna bör även ge spontant återmuterande platträckningar av kolonier inom de frekvensområden som kan förväntas från laboratoriets historiska kontrolldata och helst inom det område som rapporteras i litteraturen.

#### 1.5.1.2 Medium

Använd en lämplig minimalagar (t.ex. innehållande Vogel-Bonner minimalmedium E och glukos) och ett agar-toppskikt som innehåller histidin och biotin eller tryptofan, så att några stycken celldelningar skall kunna ske (1) (2) (9).

#### 1.5.1.3 Metabolisk aktivering

Bakterier bör exponeras för testsubstanten både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det vanligaste systemet som används är en post-mitokondriell fraktion där en kofaktor tillsatts (S9) vilken beretts ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en kombination av fenobarbiton och  $\beta$ -naftoflavon (18) (20) (21). Den post-mitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området från 5 till 30% v/v i S9-blandningen. Valet av och betingelserna hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen. För azofärger och diazoämnen, kan användning av ett reduktivt system för metabolisk aktivering vara lämpligare (6) (13).

#### 1.5.1.4 Beredning av testsubstanten

Fasta testsubstanter bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om detta är lämpligt, före det att bakterierna behandlas. Flytande testsubstanter kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut före behandling. Nygjorda beredningar bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Lösningsmedel/vehiklar bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstanten och bör vara förenliga med bakteriernas överlevnad samt S9-aktivitet (22). Om man använder andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

### 1.5.2 Försöksbetingelser

#### 1.5.2.1 Teststammar (se 1.5.1.1)

#### 1.5.2.2 Exponeringskoncentration

Cytotoxiciteten och lösligheten i den slutliga behandlingsblandningen är några av de kriterier som man måste ta hänsyn till vid bestämningen av den högsta mängd av testsubstanten som skall användas.

Det kan vara bra att bestämma toxicitet och löslighet i ett förberedande experiment. Cytotoxicitet kan detekteras genom en minskning av antalet återmuterande kolonier, en uttunning eller minskning av bakgrundstillväxten, eller graden av överlevnad hos de behandlade kulturerna. Cytotoxiciteten hos en substans kan ändras i närvaro av system för metabolisk aktivering. Olöslighet bör fastställas som en utfällning i den slutliga blandningen, under de verkliga försöksbetingelserna och skall vara synlig för blotta ögat.

Den maximala rekommenderade testkoncentrationen för lösliga icke-cytotoxiska substanser är 5 mg/platta eller 5 µl/platta. För icke-cytotoxiska substanser som inte är lösliga vid 5 mg/platta eller 5 µl/platta, bör en eller flera av de koncentrationer som testas vara olösliga i den slutliga behandlingsblandningen. Testsubstanser som är cytotoxiska redan under 5 mg/platta eller 5 µl/platta bör testas upp till en cytotoxisk koncentration. Fällningen torde inte störa bestämningen.

Minst fem olika analyserbara koncentrationer av testsubstansen bör användas, med ungefär halva log-intervall (dvs.  $\sqrt{10}$ ) mellan testpunkterna för ett inledande experiment. Mindre intervall kan vara lämpliga när ett koncentrationssvar håller på att undersökas. Testning över en koncentration på 5 mg/platta eller 5 µl/platta kan övervägas vid utvärdering av substanser som innehåller avsevärda mängder av potentiellt mutagena föroreningar.

#### 1.5.2.3 Negativa och positiva kontroller

Samtidiga stamspecifika positiva och negativa kontroller (lösningssmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje försök. Positiva kontrollkoncentrationer som visar på det effektiva utfallet för varje försök bör väljas.

För försök där ett system för metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollreferenssubstansen väljas på basis av de typer av bakteriestammar som används.

De följande substanserna utgör exempel på lämpliga positiva kontroller för försök med metabolisk aktivering:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
9,10-dimetylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetylbensantracen	57-97-6	200-359-5
bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	

Följande substans är en lämplig positiv kontroll för den reduktiva metaboliska aktiveringsmetoden:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
kongorött	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracen bör inte användas som den enda indikatorn på effektiviteten hos S9-blandningen. Om 2-aminoantracen används, bör varje sats av S9 även karakteriseras med en mutagen som kräver metabolisk aktivering med hjälp av mikrosomala enzymer, t.ex. bens[a]pyren, dimetylbensantracen.

Följande substanser utgör exempel på sortspecifika positiva kontroller för försök som utförs utan exogena system för metabolisk aktivering:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer	Stam
Natriumazid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 och TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 och TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 och TA 97a
Kumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA och TA 102
N-etyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA(pKM101)
4-nitroquinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA(pKM101)
Furylfuramid (AF2)	3688-53-7		plasmidinnehållande stammar

Andra lämpliga positiva kontrollreferenssubstanser kan användas. Användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av enbart lösningsmedel eller vehikel, utan testsubstans, och i övrigt hanterade på samma sätt som för de behandlade grupperna, bör inkluderas. Obehandlade kontroller bör dessutom även användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga farliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

### 1.5.3 Förfarande

Vid plattinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), utan metabolisk aktivering, blandas vanligen 0,05 ml eller 0,1 ml av testlösningarna, 0,1 ml av färsk bakteriekultur (innehållande ungefär  $10^8$  livsdugliga celler) och 0,5 ml av steril buffert med 2,0 ml av toppskiktsgar. För ett försök med metabolisk aktivering blandas vanligen 0,5 ml av en metabolisk aktiveringsblandning, vilken innehåller en adekvat mängd postmitokondriell fraktion (i området från 5 till 30% v/v i den metaboliska aktiveringsblandningen) med toppskiktsgar (2,0 ml), tillsammans med bakterierna och testsubstansen/testlösningen. Innehållet i varje rör blandas och hålls över ytan på en minimalagarplatta. Toppskiktsgarn tillåts att stelna innan inkubering sker.

För förinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6), förinkuberas testsubstansen/testlösningen med teststammen (innehållande ungefär  $10^8$  livsdugliga celler) och steril buffert eller med system för metabolisk aktivering (0,5 ml), vanligen under 20 minuter eller längre vid 30–37°C, innan den blandas med toppskiktsgarn och hålls uppå ytan på en minimalagarplatta. Vanligen blandas 0,05 eller 0,1 ml av testsubstansen/testlösningen, 0,1 ml bakterier och 0,5 ml av S9-blandningen eller steril buffert blandat med 2,0 ml av toppskiktsgar. Rören bör luftas under förinkubationen med hjälp av en skakmaskin.

För att möjliggöra en rimlig uppskattning av variationen bör tre plattor användas vid varje dosnivå. Användning av två plattor är acceptabelt när detta är vetenskapligt motiverat. Förlust av en enstaka platta innebär inte nödvändigtvis att ett försök blir ogiltigt.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med lämpliga metoder, såsom i slutna kärl (12) (14) (15) (16).

#### 1.5.4 Inkubering

Alla plattor i en given assay bör inkuberas vid 37°C under 48–72 timmar. Efter inkubationsperioden räknas antalet återmuterande kolonier per plattor.

### 2. DATA

#### 2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör presenteras som antalet återmuterande kolonier per platta. Antalet återmuterande kolonier på såväl negativa (lösningsmedelskontroll och obehandlad kontroll, om en sådan används) och positiva kontrollplattor bör även anges. Individuella platträkningar, medelantalet för de återmuterande kolonierna per platta och standardavvikelsen bör uppges för såväl testsubstansen som för positiva och negativa (obehandlade och/eller (lösningsmedels) kontroller.

Der finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta motiveras. Vid uppföljningsexperiment bör man överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. De försöksparametrar som skulle kunna modifieras innefattar koncentrationsindelningen, metoden för behandling (plattinkorporering eller förinkubation i vätska), och betingelser för metabolisk aktivering.

#### 2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning över hela det testade området och/eller en reproducerbar ökning, vid en eller flera koncentrationer, av antalet återmuterande kolonier per platta för minst en stam, med eller utan ett system för metabolisk aktivering (23). Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (24). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om svaret är positivt

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av återmutation hos bakterier indikerar att substansen inducerar punktmutationer genom bassubstitutioner eller förskjutningar i genomet hos antingen *Salmonella typhimurium* och/eller *Escherichia coli*. Negativa resultat indikerar att testsubstansen inte är mutagen hos den testade sorten under dessa försöksbetingelser.

### 3. RAPPORTERING

#### TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering för valet av lösningsmedel/vehikel
- testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet /vehikeln, om detta är känt,

Stammar:

- stammar som används
- antalet celler per kultur
- karakteristika för stammen

Försöksbetingelser:

- mängd av testsubstansen per platta (mg/platta eller µl/platta) med grund för val av dos och antal plattor per koncentration
- använda medier
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitets-kriterier
- behandlingsprocedurer

Resultat:

- tecken på toxicitet
- teken på utfällning
- individuella platträkningar
- medelantalet återmuterande kolonier per platta och standardavvikelse
- dos/respons-förhållande, där detta är möjligt
- statistiska analyser, om några sådana finns
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser
- historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

#### 4. REFERENSER

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenic Test. *Mutation Res.*, 31, s. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.* 113, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, s. 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, *Mutation Res.*, 38, s. 33-42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (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, s. 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, s. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, s. 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, s. 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, s. 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, s. 249-258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, s. 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 *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, s. 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, s. 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, s. 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, s. 85-88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, 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, s. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, s. 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, s. 83-91.
- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, 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, s. 28-65."

## BILAGA 4E

**"B.17. MUTAGENICITET – TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER IN VITRO****1. METOD**

Denna metod är en kopia av OECD TG 476, Test av genmutationer hos däggdjursceller *in vitro* (*In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test* (1997)).

**1.1 INLEDNING**

Genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan användas för att detektera genmutationer som inducerats med hjälp av kemiska substanser. Lämpliga cellinjer innefattar L5178Y muslymfomceller, CHO-, CHO-AS52- och V79-linjerna från kinesiska hamsterceller och TK6 lymfoblastoidceller från människa (1). I dessa cellinjer mäter de vanligast använda genetiska slutpunkterna mutation av tymidinkinas (TK) och hypoxanthinguanin fosforibosyltransferas (HPRT), och en transgen av xanthin-guanin fosforibosyltransferas (XPRT). Mutationstesterna TK, HPRT och XPRT detekterar olika spektra av genetiska händelser. Den autosomala lokaliseringen av TK och XPRT kan göra det möjligt att detektera genetiska händelser (t.ex. stora deletioner) som inte detekteras vid HPRT-lokuset på X-kromosomer (2) (3) (4) (5) (6).

I genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan kulturer med etablerade cellinjer eller celltyper användas. De celler som används väljs ut på basis av tillväxtförmåga vid odling och stabilitet med avseende på spontan mutationsfrekvens.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta system för metabolisk aktivering kan inte fullt ut efterlikna förhållandena *in vivo* hos däggdjur. Försiktighet bör iakttagas så att man undviker förhållanden som skulle kunna leda till resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten. Positiva resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten kan uppkomma från förändringar i pH, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (7).

Detta test används för att undersöka möjliga mutagener och karcinogener i däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena i däggdjur. Det föreligger dock ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt fler bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar uppträda genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som är frånvarande i bakterieceller (6).

Se även Allmän inledning, del B.

**1.2 DEFINITIONER**

*framåtmutation*: en genmutation från den parentala typen till den mutanta formen, vilket ger upphov till en förändring eller en förlust av den enzymatiska aktiviteten i funktionen hos det protein som bildas.

*mutagener som ger basparsubstitutioner*: substanser som orsakar substitution av ett eller flera baspar i DNA.

*förskjutnings (frameshift)-mutagener*: substanser som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA-molekylen.

*fenotypisk expressionstid*: en period under vilken celler som nyligen muterat töms på oförändrade genprodukter.

*mutantfrekvens*: antalet mutanta celler som observerats, delat med antalet livskraftiga celler.

*relativ total tillväxt*: ökningen av antalet celler över tiden jämfört med en kontrollpopulation av celler, beräknat som produkten av suspensionstillväxten i förhållande till den negativa kontrollen, gånger kloningseffektiviteten i förhållande till den negativa kontrollen.

*relativ suspensionstillväxt*: ökning av cellantalet delat med expressionsperioden i relation till den negativa kontrollen.

*viabilitet:* kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna vid tiden för utstryk på platta, under selektiva betingelser efter expressionsperioden.

*överlevnad:* kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna när utstryk på platta sker vid behandlingsperiodens slut. Överlevnaden uttrycks vanligen i förhållande till överlevnaden hos kontrollens cellpopulation.

### 1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Celler som lider brist på tymidinkinas (TK), beroende på mutationen  $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ , är resistent mot de cytotoxiska effekterna av pyrimidinanalogen trifluortymidin (TFT). Celler med väl fungerande tymidinkinas är känsliga för TFT, eftersom TFT ger upphov till inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celledelning. Mutanta celler kan således utvecklas i närvaro av TFT, medan däremot normala celler, som innehåller tymidinkinas, inte klarar detta. Celler som lider brist på HPRT eller XPRT kan på liknande sätt väljas ut genom resistens mot 6-tioguanin (TG) eller 8-azaguanin (AG). Egenskaperna hos testsubstansen bör noggrant gås igenom om en basanalog eller ett ämne som är relaterat till det selektiva ämnet testas i något av testerna för genmutationer i däggdjursceller. Exempelvis bör varje misstänkt selektiv toxicitet hos testsubstansen mot mutanta och icke-mutanta celler undersökas. Det sätt som det selekterande systemet/ämnet fungerar på, måste således bekräftas när man testar kemikalier som är strukturellt relaterade med det selektiva ämnet (8).

Celler i suspension eller kulturer i form av ett enkelskikt exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under en lämplig tidsperiod och subkultiveras för att bestämma cytotoxiciteten och för att tillåta fenotypisk expression innan mutantvalet sker (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxiciteten bestäms i vanliga fall genom att mäta den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller den relativa totala tillväxten för kulturerna efter behandlingsperioden. De behandlade kulturerna bibehålls i ett tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje selekterat lokus och celltyp, för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer. Mutationsfrekvensen bestäms genom att inockulera ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutanta celler, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas cellerna. Mutationsfrekvensen erhålls från antalet mutanta kolonier i selektivt medium och antalet kolonier i icke-selektivt medium.

### 1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

#### 1.4.1 Förberedelser

##### 1.4.1.1 Celler

Det finns ett antal olika celltyper som kan användas i detta test, inklusive subkloner från L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 eller TK6-celler. De celltyper som används i detta test bör ha en demonstrerad känslighet mot kemiska mutagener, en hög kloningseffektivitet och en stabil spontan mutationsfrekvens. Cellerna bör kontrolleras med avseende på kontaminering från mykoplasma och bör inte användas om kontaminering skett.

Testet bör utformas på ett sådant sätt att det har en förutbestämd känslighet och styrka. Antalet celler, kulturer och koncentrationer av testsubstansen som används bör reflektera dessa definierade parametrar (14). Det minsta antalet livskraftiga celler som överlever behandlingen och används vid varje stadium av testet bör baseras på den spontana mutationsfrekvensen. En generell regel är att använda ett cellantal som är minst tio gånger det inverterade värdet av den spontana mutationsfrekvensen. Det rekommenderas dock att minst  $10^6$  celler används. Adekvata historiska data för det cellsystem som används bör vara tillgängliga för att kontrollera att testet ger reproducerbara resultat.

##### 1.4.1.2 Betingelser för media och kulturer

Lämpliga kulturmedia och inkubationsbetingelser (odlingskärl, temperatur,  $CO_2$ -koncentration och luftfuktighet) bör användas. Mediet bör väljas ut i enighet med de selektiva system och celltyper som används i testet. Det är särskilt viktigt att betingelserna för kulturerna väljs på ett sådant sätt att man säkrar en optimal celltillväxt under expressionsperioden och en förmåga till bildning av kolonier för både mutanta och icke-mutanta celler.

#### 1.4.1.3 *Förberedelse av kulturer*

Celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium och inkuberas vid 37 °C. Innan de används i detta test kan kulturerna behöva tvättas rena från redan existerande mutanta celler.

#### 1.4.1.4 *Metabolisk aktivering*

Celler bör exponeras för testsubstanten både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det system som vanligen används är en postmitokondriell fraktion som tillsatts en kofaktor (S9), beredd ur levern från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) eller en kombination av fenobarbiton och  $\beta$ -naftoflavon (19) (20).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1–10% v/v i det slutliga testmediet. Valet av och betingelserna för ett system för metabolisk aktivering kan vara beroende av klassen av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen.

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive konstruktion av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan ge en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som används bör vara vetenskapligt motiverat (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen av testsubstanten).

#### 1.4.1.5 *Beredning av testsubstanten*

Fasta testsubstanter bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut innan cellerna behandlas, om detta är lämpligt. Flytande testsubstanter kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstanten bör användas om inte stabilitetsdata tyder på att lagring kan accepteras.

### 1.4.2 **Försöksbetingelser**

#### 1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstanten och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom tillsats av en molekylsikt.

#### 1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som skall övervägas när den högsta koncentrationen skall fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperimentet med hjälp av lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom relativ kloningseffektivitet (överlevnad) eller relativ total tillväxt. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

Minst fyra analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationsnivåerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och  $\sqrt{10}$ . Om den maximala koncentrationen är baserad på cytotoxicitet bör detta då resultera i ungefär 10–20% (men inte mindre än 10%) relativ överlevnad (relativ kloningseffektivitet) eller relativ total tillväxt. För relativt icke-cytotoxiska substanser, bör den maximala testkoncentrationen vara 5 mg/ml, 5  $\mu$ l/ml eller 0,01 M, beroende på vilket som är det lägsta.

Relativt olösliga substanser bör testas upp till eller över sin löslighetsgräns under odlingsbetingelserna för kulturen. Bevis för olöslighet bör bestämmas i det slutliga behandlingsmediet för vilket cellerna exponeras. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid behandlingens början och slutpunkt, eftersom lösligheten kan förändras under exponeringsförloppet i testsystemet beroende på närvaron av celler, S9, serum, etc. Olöslighet kan detekteras med hjälp av blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

1.4.2.3 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av sådant slag att den kräver aktivering för att ge ett mutagent svar.

I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanter.

Betingelser för metabolisk aktivering	Lokus	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Frånvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små och stora kolonier)	Metylmetansulfonat	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0
	Etylnitrosourea		759-73-9	212-072-2
	Närvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	3-Metylkolantren	56-49-5
N-Nitrosodimetylamin			62-75-9	200-549-8
7,12-Dimetylbensantracen			57-97-6	200-359-5
TK (små och stora kolonier)		Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
		Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
		Bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-Metylkolantren	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-Nitrosodimetylamin (för höga nivåer av S-9)	62-75-9	200-549-8
		Bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5

Andra lämpliga referenssubstanter för positiv kontroll kan användas, t.ex. om ett laboratorium har en historisk databas med 5-brom-2'-deoxiuridin [CAS-nummer 59-14-3, EINECS-nummer 200-415-9] skulle även denna referenssubstans kunna användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av enbart ett lösningsmedel eller en vehikel i behandlingsmediet och behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna bör inkluderas. Dessutom bör även obehandlade kontroller användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.4.3 **Förfarande**1.4.3.1 *Behandling med testsubstansen*

Prolifererande celler bör exponeras för testsubstansen både med och utan metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3–6 timmar effektivt). Exponeringstiden kan utsträckas över en eller flera cellcykler.

Antingen en eller två behandlade kulturer kan användas vid varje koncentration som testas. När enstaka kulturer används, bör antalet koncentrationer ökas så att ett adekvat antal kulturer säkerställs för analys (t.ex. minst åtta analyserbara koncentrationer). Två negativa (lösningsmedels-) kontrollkulturer bör användas.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, såsom slutna odlingskärl (21) (22).

#### 1.4.3.2 Mätning av överlevnad, viabilitet och mutantfrekvens

Mot slutet av exponeringsperioden tvättas cellerna och odlas för att bestämma överlevnad och för att medge att den mutanta fenotypen uttrycks. Mätning av cytotoxicitet, genom en bestämning av den relativa klonings-effektiviteten (överlevnad) eller relativa totala tillväxten för kulturen, initieras normalt efter behandlingsperioden.

Varje lokus har definierade krav på minimitid, så att närmast optimal fenotypisk expression av nyligen inducerade mutanter medges (HPRT och XPRT kräver minst 6–8 dagar och TK minst två dagar). Celler odlas ofta i ett medium med och utan selektiva ämnen för att såväl antalet mutanter som kloningens effektivitet skall kunna bestämmas. Mätningen av viabiliteten (används för att beräkna mutantfrekvensen) initieras vid slutet av expressionstiden genom utstryk på platta i ett icke-selektivt medium.

Om testsubstansen är positiv i testet L5178Y TK<sup>+/−</sup>, bör storleksmätning av kolonierna utföras på åtminstone en av testkulturerna (den högsta positiva koncentrationen) och på de negativa och positiva kontrollerna. Om testsubstansen är negativ i testet L5178Y TK<sup>+/−</sup>, bör storleksmätning av kolonierna utföras på de negativa och positiva kontrollerna. I undersökningar där TK6TK<sup>+/−</sup> används, kan storleksmätning av kolonierna utföras även där.

## 2. DATA

### 2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör inkludera en bestämning av cytotoxicitet och viabilitet, räkning av kolonier och mutantfrekvenser för de behandlade kulturen och kontrollkulturerna. Om testet L5178Y TK<sup>+/−</sup> ger ett positivt svar, påvisas kolonier utifrån kriterier för små och stora kolonier för åtminstone en koncentration av testsubstansen (högsta positiva koncentrationen) och för de negativa och positiva kontrollerna. Den molekylära och cytogenetiska naturen hos både stora och små mutanta kolonier har undersökts mycket ingående (23) (24). I testet TK<sup>+/−</sup> påvisas kolonier utifrån kriterier för normal tillväxt (stora) och långsam tillväxt (små) av kolonier (25). Mutanta celler som har utsatts för den mest omfattande genetiska skadan uppvisar förlängda dubblingstider och bildar därför små kolonier. Denna skada sträcker sig typiskt i en skala från förlust av hela genen till karyotypiskt synliga kromosomavvikelser. Induktion av mutanter som ger små kolonier har associerats med kemikalier som inducerar omfattande kromosomavvikelser (26). Mutanta celler som är mindre allvarligt påverkade växer med hastigheter liknande de som parentala celler uppvisar och bildar stora kolonier.

Överlevnad (relativa kloningseffektiviteter) eller relativ total tillväxt bör anges. Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet mutanta celler per antalet celler som överlever.

Individuella data för kulturen bör anges. Alla data bör dessutom sammanfattas i tabellform.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta ett negativt resultat bör detta motiveras. Vid tvetydiga eller negativa resultat bör man vid uppföljningsexperiment överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. Försöksparametrar som kan behöva modifieras inkluderar koncentrationsstegen och villkoren för metabolisk aktivering.

### 2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATET

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning i mutationsfrekvensen. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultatet. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av genmutationen *in vitro* hos däggdjursceller indikerar att testsubstansen inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används. Ett positivt koncentrationssvar som är reproducerbart är mycket meningsfullt. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används.

### 3. **RAPPORTERING**

#### TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering för valet av vehikel/lösningsmedel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Celler:

- cellernas typ och källa
- antalet cellkulturer
- antalet cellpassager, om detta är tillämpligt
- metoder för bibehållande av cellkulturen, om detta är tillämpligt
- frånvaro av mykoplasma

Försöksbetingelser:

- grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive t.ex. data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar, om dessa finns att tillgå
- mediernas sammansättning, CO<sub>2</sub>-koncentration
- testsubstansens koncentration
- den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym
- inkubationstemperatur
- inkubationstid
- behandlingens varaktighet
- celldensitet under behandlingen
- typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier
- positiva och negativa kontroller
- expressionsperiodens varaktighet (inklusive antalet celler som inokulerats, samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt)
- selektiva ämnen
- kriterier för när tester skall anses som positiva, negativa eller tvetydiga

- metoder som används för att räkna antalet livskraftiga och muterade celler
- definition av kolonier vars storlek och typ skall beaktas (inklusive kriterier för 'små' och 'stora' kolonier, där detta är tillämpligt)

Resultat:

- tecken på toxicitet
- tecken på utfällning
- data för pH och osmolalitet under det att exponering för testsubstansen sker, om sådana data har uppmätts
- koloniernas storlek (i de fall de räknats) för åtminstone negativa och positiva kontroller
- laboratoriets möjligheter att detektera mutanter som ger små kolonier med L5178Y TK<sup>±</sup>-systemet, där detta är tillämpligt
- dos/respons-förhållande, där detta är möjligt
- statistiska analyser, om sådana finns
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata
- historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden och standardavvikelser
- mutationsfrekvens

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

#### 4. REFERENSER

- (1) Moore, M. M., DeMarini, D. M. DeSerres, F. J. and Tindal, 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, s. 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, s. 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*, s. 394-403.
- (5) Aaron, C. S., and Stankowski, Jr. L. F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of the Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, s. 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, s. 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, s. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, 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, s. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Balton, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK<sup>+/+</sup> - TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B.J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, s. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. 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, s. 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, s. 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, s. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>+/+</sup> - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.*, 59, s. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173-215.
- (19) Elliott, E. M., Combes, R. D., Elcombe, 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, s. 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, s. 85-88.
- (21) 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, s. 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 Gollagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, s. 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, s. 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) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/+</sup> - Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 151, s. 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, s. 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<sup>+/+</sup> - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, s. 609-614.

## BILAGA 4F

**"B.23. SPERMATOGONIAL TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR****1. METOD**

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 483, Spermatogonial test av kromosomavvikelser hos däggdjur (Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997)).

**1.1 INLEDNING**

Ändamålet med testet av spermatogoniala avvikelser *in vivo* hos däggdjur, är att identifiera de substanser som orsakar strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala celler hos däggdjur (1) (2) (3) (4) (5). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. Denna metod är inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för detta ändamål. Kromosommutationer och relaterade händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor.

Detta test mäter kromosomhändelser i spermatogoniala könsceller och förväntas därför utgöra en förutsägelse på induktion av ärftliga mutationer i könsceller.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Detta cytogenetiska test *in vivo* detekterar kromosomavvikelser i spermatogoniala mitoser. Andra målceller omfattas inte av denna metod.

För att detektera avvikelser av kromatidtyp i spermatogoniala celler, bör den första mitotiska celldelningen efter behandlingen undersökas innan dessa skador förloras i de påföljande celldelningarna. Ytterligare information från behandlade spermatogoniala stamceller kan erhållas genom meiotisk kromosomanalys av avvikelser av kromosomtyp vid diakinesmetafas I, när de behandlade cellerna förvandlas till spermacyter.

Detta *in vivo*-test är utformat för att undersöka om mutagener för somatiska celler även är aktiva i könsceller. Det spermatogoniala testet är dessutom relevant för att fastställa risken för mutagenicitet, eftersom det medger att faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och reparationsprocesser för DNA beaktas.

Ett antal generationer av spermatogonier finns närvarande i testikeln med ett spektrum av känslighet för kemisk behandling. De avvikelser som detekteras representerar alltså ett samlat svar på behandlade spermatogoniala cellpopulationer, där de mera talrika differentierade spermatogoniala cellerna överväger. Olika generationer av spermatogonier kan där komma i kontakt med det stora kretsloppet. Om detta sker eller ej avgörs av deras position inne i testikeln, beroende på den fysiska och fysiologiska Sertoli-cellbarriären och på blod/testikelbarriären.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå fram till målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

**1.2 DEFINITIONER**

*avvikelse av kromatidtyp*: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

*avvikelse av kromosomtyp*: strukturell kromosomskada uttryckt som brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

*lucka*: en akromatisk skada som är mindre än bredden på en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

*numerisk avvikelse*: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet karakteristiskt för det försöksdjur som används.

*polyploidi*: en multipel av det haploida kromosomantalet ( $n$ ) som skiljer sig från det diploida (d.v.s.  $3n$ ,  $4n$  o.s.v.).

*Strukturell avvikelse*: en förändring av kromosomstrukturen som är detekterbar med hjälp av en mikroskopisk undersökning av metafasstadiet vid celledelning, observerad i form av deletioner, interna eller externa utbyten.

### 1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur exponeras för testsubstansen genom ett lämpligt exponeringssätt och avlivas sedan vid en lämplig tid efter behandling. Innan avlivningen sker, behandlas försöksdjuren med en substans som gör att celledelningen stannar upp i metafase (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosomberedningar görs sedan från könsceller och färgas in, varpå de celler som är i metafase analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

### 1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

#### 1.4.1 **Förberedelser**

##### 1.4.1.1 *Val av djurarter*

Handjur av kinesiska hamstrar och möss används i stor utsträckning. Det är även möjligt att använda hanar från andra lämpliga däggdjursarter. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen skall påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga  $\pm 20\%$  av medelvikten.

##### 1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60%.

##### 1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar innan undersökningen börjar.

##### 1.4.1.4 *Beredning av doser*

Festa testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

### 1.4.2 **Försöksbetingelser**

#### 1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

#### 1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa (lösningsmedel/vehikel) kontroller bör inkluderas i varje test. Utom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett sätt om är identiskt med sättet för försöksdjuren i de grupper som behandlas.

Positiva kontroller bör de strukturella kromosomavvikelser *in vivo* i spermatogoniala celler när administrering sker vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden.

Positiva kontroldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas när sådana finns att tillgå. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nummer	Einecs-nummer
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer akrylamid	79-06-1	201-173-7
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade med enbart ett lösningsmedel eller en vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens för celler med kromosomavvikelser mellan försöksdjuren kan påvisas från historiska kontrolldata. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas, om det inte finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

## 1.5 FÖRFARANDE

### 1.5.1 Antal försöksdjur

Varje behandlad grupp och kontrollgrupp måste inkludera minst fem analyserbara hanar.

### 1.5.2 Behandlingsschema

Testsubstanser bör lämpligen administreras en eller två gånger (d.v.s. som en enstaka behandling eller som två behandlingar). Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, d.v.s. två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av stora volymer. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

I den högsta dosgruppen används två provtagningstider efter behandlingen. Eftersom cellcykelns kinetik kan påverkas av testsubstansen, används en tidig och en sen provtagningstid vid ungefär 24 och 48 timmar efter behandlingen. För andra doser än den högsta dosen bör en provtagningstid vid 24 timmar eller 1,5 cellcyklers längd efter behandlingen användas, om inte andra provtagningstider är kända för att vara lämpligare för detektion av effekter (6).

Dessutom kan andra provtagningstider användas. När det t.ex. gäller fall där kemikalier kan inducera kromosom-'lagging', eller när de kan ge upphov till S-oberoende effekter, kan tidigare provtagningstider visa sig vara lämpligare (1).

Man måste i varje enskilt fall fastställa om det är lämpligt att använda ett upprepat behandlingsschema. Efter ett upprepat behandlingsschema bör försöksdjuren avlivas 24 timmar (1,5 gånger cellcykelns längd) efter den sista behandlingen. Ytterligare provtagningstider kan användas där så är lämpligt.

Innan avlivningen sker, injiceras försöksdjuren intraperitonealt med en lämplig dos av en substans som stoppar celldelningen i metafase (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Provtagning på försöksdjur sker därefter med lämpliga intervall. För möss ligger detta intervall på ungefär 3–5 timmar och för kinesiska hamstrar ligger intervallet på ungefär 4–5 timmar.

### 1.5.3 Dosnivåer

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar och behandlingsschema som senare skall användas i huvudundersökningen. Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett intervall som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endas den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör.

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas ifrån fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i den spermatogoniala cellerna (t.ex. en reduktion i kvoten av spermatogoniala mitoser hos de första och andra meiotiska metafaser; denna reduktion bör inte överskrida 50%).

### 1.5.4 'Limit-test'

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte per upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i 'limit-testen'.

### 1.5.5 Administrering av doser

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är större än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom att en justering av koncentrationen sker för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

### 1.5.6 Kromosomberedning

Omedelbart efter avlivning, tas cellsuspensioner ut från en eller båda testiklarna, exponeras för en hypoton lösning och fixeras. Cellerna stryks sedan ut på utstryksglas och färgas in.

### 1.5.7 Analys

För varje försöksdjur bör minst 100 väl spridda metafaser analyseras (d.v.s. ett minimum på 500 metafaser per grupp). Detta antal skulle kunna reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör få en oberoende kodning innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringsprocedurerna ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafase, med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påvisas innehålla ett antal centromerer som motsvarar antalet  $2N \pm 2$ .

## 2. DATA

### 2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. För varje individuellt försöksdjur bör antalet celler med strukturella kromosomavvikelser och antalet kromosomavvikelser per cell utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen registreras separat och rapporteras men inkluderas i allmänhet inte i den totala avvikelse frekvensen,

Om såväl mitos som meios observeras, bör förhållandet mellan spermatogoniala mitoser och de första och andra meiotiska metafaser fastställas som ett mått på cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollförsöksdjur vid ett totalt prov på 100 celler som delar sig per djur för att etablera en möjligt cytotoxisk effekt. Om endast mitos kan observeras, bör mitosindexet bestämmas i minst 1 000 celler för varje försöksdjur.

## 2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av det relativa antalet celler med kromosomavvikelse eller en tydlig ökning av antalet celler hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningsstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (8). Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från *in vivo*-test för spermatogoniala kromosomavvikelse indikerar att testsubstansen inducerar strukturella kromosomavvikelse i könscellerna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar kromosomavvikelse i könscellerna på den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når målvävnaden bör diskuteras.

## 3. RAPPORTERING

### TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering av valet av vehikel
- testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal och ålder
- ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

- data från en omfångsundersökning, om en sådan genomförs
- grund för valet av dosnivå
- grund för administrationsvägen
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för avlivningstiderna
- omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvattnen (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpligt

- uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman
- metoder för mätningar av toxicitet
- identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafase, deras koncentration och behandlingens varaktighet
- metoder för preparation av utstryksglas
- kriterier för hur avvikelser påvisas
- antalet celler som analyserats per försöksdjur
- kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

- tecken på toxicitet
- mitotiskt index
- förhållandet mellan spermatogoniala mitoceller och de första och andra meiotiska metafaser
- typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur
- det totala antalet avvikelser per grupp
- antalet celler med avvikelser per grupp
- dos/respons-förhållande, där så är möjligt
- statistiska analyser, om några sådana förekommer
- samtidiga negativa kontrolldata
- historiska negativa kontrolldata med omfång, medelvärden och standardavvikelser
- samtidiga positiva kontrolldata
- förändringar i ploiditet, om sådana har observerats.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

#### 4. REFERENSER

- (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, s. 477-484.
- (2) Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 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, s. 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, s. 115-141.
  - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.* 52, s. 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, s. 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, s. 313-319.
  - (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, 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 Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184-232."
-



## BILAGA 4G

**"B.39. TEST AV REPARATIONSSYNTES (UDS) HOS LEVERCELLER FRÅN DÄGGDJUR IN-VIVO****1. METOD**

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 486, Test av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur *in vivo* (Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *in Vivo* (1997)).

**1.1 INLEDNING**

Ändamålet med testet av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur *in vivo* är att identifiera testsubstanser som inducerar DNA-reparation i leverceller från behandlade försöksdjur (se (1) (2) (3) (4)).

Detta *in vivo*-test erbjuder en metod för undersökning av genotoxiska effekter av kemikalier i levern. Slutpunktmätning är indikativt för DNA-skador och påföljande reparation i leverceller. Levern är vanligen det huvudsakliga sätet för metabolismen av absorberade ämnen. Det är således ett lämpligt säte för att mäta DNA-skador *in vivo*.

Om det finns bevis för att testsubstansen inte kommer att nå målvävnaden är det inte lämpligt att använda detta test.

Reparationssyntesens slutpunkt mäts genom att bestämma upptaget av märkta nukleosider i celler som inte undergår reguljär DNA syntes (S-fas). Den teknik som är den mest använda är bestämning av upptag av tritiummärkt tymidin (H-TdR) med hjälp av autoradiografi. Rättlever används med fördel för UDS-tester *in vivo*. Andra vävnader än lever kan användas, men omfattas inte av denna metod.

Detektionen av ett UDS-svar är beroende av antalet DNA-baser som 'klippas bort' och byts ut vid platsen för skadan. UDS-testet är därför särskilt värdefullt för att detektera substansinducerad 'longpatch'-reparation (20–30 baser). 'Shortpatch'-reparation (1–3 baser) detekteras däremot med mycket lägre känslighet. Vidare kan mutagena händelser inträffa på grund av utebliven reparation, felreparation eller felreplikation av DNA-skador. Omfattningen av UDS-svaret ger ingen indikation på noggrannheten i reparationsprocessen. Dessutom är det möjligt att ett mutagen reagerar med DNA men att DNA-skadan inte repareras via en reparationsprocess där DNA-baser 'klippas bort' och byts ut. Bristen på specifik information rörande mutagen aktivitet, erhållen genom UDS-testet, kompenseras för genom dess potentiella känslighet, eftersom den mäts i hela genom.

Se även Allmän inledning, del B.

**1.2 DEFINITIONER**

*celler som repareras*: ett nettoantal korn i kärnan (net nuclear grain, NNG) som är större än ett förvalt värde, vilket skall verifieras av det laboratorium som utför testet.

*nettoantal korn i kärnan (NNG)*: kvantitativ mätning av UDS-aktivitet hos celler i autoradiografiska UDS-tester, beräknade genom att subtrahera medelantalet av de cytoplasmiska kornen i kärnekvivalenta cytoplasmiska områden (CG) från antalet korn i kärnan (nuclear grains, NG):  $NNG = NG - CG$ . NNG-räkningar beräknas för individuella celler och slås sedan samman för celler i en kultur, i parallella kulturer, etc.

*reparationssyntes (UDS)*: DNA-reparationssyntes efter 'bortklippning' och avlägsnande av en DNA-sträng som innehåller ett avsnitt med skador inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. (UDS)

**1.3 TESTMETODENS PRINCIP**

UDS-testet med leverceller från däggdjur *in vivo* indikerar DNA-reparationssyntes efter 'bortklippning' och avlägsnande av en sträng med DNA innehållande ett avsnitt med skador, vilka inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. Testet baseras i vanliga fall på en inkorporering av  $^3\text{H-TdR}$  i DNA hos leverceller, vilka har en låg frekvens av celler som befinner sig i cellcykelns S-fas. Upptaget av  $^3\text{H-TdR}$  bestäms vanligen genom autoradiografi, eftersom denna teknik inte är så mottaglig för interferens från celler i S-fas som, t.ex. vätske-scintillationsräkning

## 1.4 BESKRIVNING AV METODEN

1.4.1 **Förberedelser**1.4.1.1 *Val av djurarter*

Vanligen används råttor men det går även bra att använda ett annat lämpligt däggdjur. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna försöksdjur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen skall påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten möjligt och den bör inte överstiga  $\pm 20\%$  av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60%.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga och vuxna försöksdjur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren skall ha en unik identifiering och hållas i sina burar under minst fem dagar innan undersökningen börjar, för att göra det möjligt för dem att akklimatiseras till förhållandena i laboratoriet.

1.4.1.4 *Berdning av testsubstansen*

Testsubstanser i fast form bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till försöksdjuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller så späds de ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabelt.

1.4.2 **Försöksbetingelser**1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå i varje oberoende utförd del av experimentet. Förutom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör utgöras av substanser som är kända för att ge UDS när de administreras vid exponeringsnivåer som kan förväntas att ge en detekterbar ökning jämfört med bakgrunden. Positiva kontroller som kräver metabolisk aktivering bör användas vid doser som framkallar ett måttligt svar (4). Doserna kan väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att de inte omedelbart avslöjar identiteten hos kokade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Tider för provtagning	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Tidiga provtagningstider (2–4 tim.)	N-Nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Sena provtagningstider (12–16 tim.)	N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanser kan användas. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen.

## 1.5 FÖRFARANDE

### 1.5.1 Försöksdjurens antal och kön

Ett lämpligt antal försöksdjur bör användas, för att man skall kunna ta hänsyn till den naturliga biologiska variationen hos testresultaten. Antalet försöksdjur bör utgöras av minst tre analyserbara försöksdjur per grupp. Där det finns en signifikant historiska databas som har ackumulerats, krävs det endast ett eller två försöksdjur för de samtidiga negativa och positiva kontrollgrupperna.

Om det vid tiden för undersökningen visar sig att det finns data som är tillgängliga från undersökningar på samma stam och där samma tillförselväg för exponering har använts, samt att dessa visar att det inte finns några betydande skillnader i toxicitet mellan könen, kan testning på endast ett kön, helst på hanar, vara tillräckligt. I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

### 1.5.2 Behandlingsschema

Testsubstanser administreras i allmänhet i form av en enstaka behandling.

### 1.5.3 Dosnivåer

Normalt används minst två olika dosnivåer. Den högsta dosen definieras som dos vilken producerar tecken på toxicitet på ett sådant sätt att högre dosnivåer, baserade på en likadan doseringsregim, skulle förväntas leda till letalitet. I allmänhet bör den lägre dosen vara 50 % till 25 % av den högre dosen.

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag med avseende på de dosbestämmande kriterierna och bör utvärderas från fall till fall. Om en undersökning för att bestämma intervallet utförs på grund av att det inte finns några lämpliga data tillgängliga, bör denna utföras i samma laboratorium, och där man använder samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som i huvudundersökningen.

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken producerar en indikation på toxicitet i levern (t.ex. pyknotiska kärnor).

### 1.5.4 Limit-test

En fullständig undersökning kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i 'limit-testen'.

### 1.5.5 Administrering av doser

Testsubstansen administreras vanligen via sondmatning genom att använda en magsond eller en lämplig intubationskanyl. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla, där de kan motiveras. Den intraperitoneala vägen rekommenderas dock inte, eftersom den skulle kunna exponera levern direkt för testsubstansen snarare än via det cirkulatoriska systemet. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror av försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 2 ml/100 g kroppsvikt. Användningen av större volymer måste motiveras. Förutom när det gäller irriterande eller korrosiva substanser, vilka normalt kommer att avslöja förvarade effekter vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen, så att konstant volym kan säkerställas vid alla dosnivåer.

### 1.5.6 Beredning av leverceller

I normala fall bereds leverceller från behandlade försöksdjur 12–16 timmar efter dosering. Ytterligare en tidig provtagningstidpunkt (normalt 2–4 timmar efter behandlingen) är normalt nödvändig om inte det finns ett tydligt positivt svar efter 12–16 timmar. Alternativa provtagningstidpunkter kan användas när det är motiverat utifrån toxikokinetiska data.

Kortvariga kulturer med leverceller från däggdjur startas genom att skölja lever *in situ* med kollagenas och att låta nyligen dissocierade leverceller fästa sig på en lämplig yta. Leverceller från negativa kontrollförsöksdjur bör ha en viabilitet (5) på minst 50%.

#### 1.5.7 Bestämning av UDS

Nyligen isolerade leverceller från däggdjur inkuberas normalt med ett medium som innehåller  $^3\text{H-TdR}$  under en tid som är tillräckligt lång, t.ex. 3–8 timmar. När inkubationsperioden går mot sitt slut, bör mediet avlägsnas från cellerna, vilken sedan kan inkuberas i ett medium som innehåller ett överskott på omärkt tymidin för att försvaga oinkorporerad radioaktivitet ('cold chase'). Cellerna tvättas sedan, fixeras och torkas. Vid längre inkubationstider, kan 'cold chase' visa sig vara onödigt. Utstryksglas doppas sedan i en autoradiografisk emulsion, exponeras i mörker (t.ex. nedkylda under 7–14 dagar) framkallas och färgas in, varpå exponerade silverkorn sedan räknas. Två till tre utstryksglas bereds från varje försöksdjur.

#### 1.5.8 Analys

Preparationerna av utstryksglas bör innehålla tillräckligt många celler med normal morfologi för att medge en meningsfull bestämning av UDS. Preparationer undersöks mikroskopiskt efter tecken på uppenbar cytotoxicitet (t.ex. pyknos, reducerade nivåer av radioaktiv märkning).

Utstryksglas bör kodas innan kornen räknas. Normalt påvisas 100 celler från varje försöksdjur från minst två utstryksglas. Om mindre än 100 celler/försöksdjur påvisas bör detta motiveras. Vid kornräkningar påvisas inte kärnor i S-fas, men proportionen av celler i S-fas kan registreras.

Mängden av  $^3\text{H-TdR}$  som inkorporerats i kärnan och cytoplasman hos morfologiskt normala celler, som bevisats av upplagringen av silverkorn, bör bestämmas med hjälp av lämpliga metoder.

Kornräkningar bestäms i kärnorna (nuclear grains, NG) och kärnekivalenta områden i cytoplasman (cytoplasmic grains, CG). CG-räkningar mäts genom att antingen ta det område av cytoplasman som har den mest omfattande märkningen, eller genom att ta ett medeltal av två eller tre slumpmässiga cytoplasmärkningar nära kärnan. Andra räknemetoder (t.ex. helcellsräkning) kan användas om de kan motiveras (6).

## 2. DATA

### 2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella utstryksglas och försöksdjursdata bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform. Räkningar av nettoantalet korn i kärnan (NNG) bör tas fram för varje cell, för varje försöksdjur och för varje dos och tid genom att subtrahera CG-räkningar från NG-räkningar. Om 'celler under reparation' räknas in, bör kriterierna för definition av 'celler under reparation' vara motiverade och baserade på historiska eller samtidiga negativa kontrolldata. Numeriska resultat kan utvärderas utifrån statistiska metoder. Om statistiska tester används, bör de selekteras och motiveras innan undersökningen utförs.

### 2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Exempel på kriterier för positiva/negativa svar innefattar:

- positiva (i) NNG-värden över ett förvalt tröskelvärde som är motiverat på basis av historiska laboratoriedata
- eller (ii) NNG-värden som är signifikant större än den samtidiga kontrollen
- negativa (i) NNG-värden inom/under det historiska kontrolltröskelvärdet
- eller (ii) NNG-värden som inte är signifikant större än den samtidiga kontrollen

Den biologiska relevansen hos registrerade data bör uppmärksammas: d.v.s. parameter såsom variationer mellan olika försöksdjur, dos/respons-förhållanden och cytotoxicitetet bör också beaktas. Statistiska metoder kan användas såsom en hjälp vid utvärderingen av testresultaten. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Ett positivt resultat från UDS-testet på leverceller från däggdjur *in vivo* indikerar att testsubstansen inducerar DNA-skador i leverceller från däggdjur *in vivo*, vilka kan repareras av reparations-syntes *in vitro*. Ett negativt resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar skador på DNA som är detekterbara med hjälp av detta test.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter skall nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

### 3. **RAPPORTERING**

#### TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

- motivering för valet av vehikel
- testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedel/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

- art/stam som används
- försöksdjurens antal, ålder och kön
- ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.
- individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

- positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel)
- data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts
- grund för valet av dosnivå
- uppgifter om beredningen av testsubstansen
- uppgifter om administreringen av testsubstansen
- grund för det sätt administreringen sker på
- metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämpligt
- omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricks-vatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpligt
- uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet
- detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman
- metoder för mätning av toxicitet
- metod för beredning och odling av leverceller
- den autoradiografiska teknik som använts

- antalet utstryksglas som preparerats och antalet celler som påvisats
- kriterier för utvärdering
- kriterier för att bedöma om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

- individuella utstryksglas, försöksdjurs- och gruppedelvärden för antalet korn i kärnan, cytoplasmiska korn, och nettoantalet korn i kärnan (NNG)
- dos/respons-förhållande, om detta är tillgängligt
- statistisk utvärdering, om en sådan utförts
- tecken på toxicitet
- samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata
- historiska negativa och positiva kontrolldata (lösningsmedel/vehikel) med intervall, medelvärden och standardavvikelser
- antalet 'celler under reparation', om detta har fastställts
- antalet celler i S-fas, om detta har bestämts
- cellernas viabilitet

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

#### 4. REFERENSER

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlison, B. and Penman, M. G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, s. 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, s. 123–133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlison, 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 s. 52–77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Herner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, s. 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, s. 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, s. 553–562.

## BILAGA 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  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/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 du Nöüytensimeter eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

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

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den DE versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

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 tulehtuminen enintään neljän tunnin altistuksessa määritettynä 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-elämällä 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.

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den DE versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den SV versionen)

In point 6.2 (Skyddsfraser för ämnen och preparat):

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.

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den FI versionen)

(Berör inte den SV versionen)



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.

(Berör inte den ES versionen)

(Berör inte den DA versionen)

(Berör inte den DE versionen)

(Berör inte den EL versionen)

(Berör inte den EN versionen)

(Berör inte den FR versionen)

(Berör inte den IT versionen)

(Berör inte den NL versionen)

(Berör inte den PT versionen)

(Berör inte den SV versionen)

—

## BILAGA 6

## "BILAGA IX

## DEL A

**Bestämmelser om barnskyddande förslutningar**

Som komplement till bestämmelserna i artikel 22.1 i detta direktiv skall behållare, oavsett storlek, som innehåller ämnen som utgör en risk för aspiration (Xn; R65) och som klassificerats och märkts i enlighet med punkt 3.2.3 i bilaga 6 till detta direktiv, med undantag för ämnen som släpps ut på marknaden i form av aerosoler eller i en behållare försedd med en förseglad sprayanordning, vara försedda med barnskyddande förslutningar.

## 1. Återförslutbara förpackningar

Barnskyddande förslutningar på återförslutbara förpackningar skall uppfylla den internationella standarden ISO 8317 (utgåvan av den 1 juli 1989) om 'Förpackning – Barnsäkra förpackningar – Krav och provningsmetoder för återförslutningsbara förpackningar' antagen av Internationella standardiseringsorganisationen (ISO).

## 2. Icke återförslutbara förpackningar

Barnskyddande förslutningar på icke återförslutbara förpackningar skall uppfylla kraven i CEN-standarden EN 862 (från mars 1997) om 'Förpackning – Barnskyddande förpackningar – Krav och provningsmetoder för icke återförslutningsbara förpackningar för andra produkter än läkemedel' antagen av Europeiska standardiseringsorganisationen (CEN).

## 3. Anmärkningar

1. Intyg om överensstämmelse med ovan nämnda standarder får endast utfärdas av laboratorier som uppfyller kraven i europeisk standard serie EN 45 000.

## 2. Särskilda fall

Om det framstår som uppenbart att en förpackning är tillräckligt säker för barn eftersom de inte kan komma åt innehållet utan hjälp av verktyg, behöver provet inte genomföras.

I alla andra fall och när det finns goda skäl att betvivla att förslutningen är säker för barn får den nationella myndigheten kräva att den som är ansvarig för att släppa ut produkten på marknaden skall lämna ett intyg från ett sådant laboratorium som beskrivs under 3.1. Av intyget skall framgå, antingen

- att förslutningen är av en sådan typ att den inte behöver provas mot den ISO-standard eller CEN-standard som avses ovan,
- eller
- att förslutningen har provats och funnits uppfylla kraven i den standard som avses ovan.

## DEL B

**Bestämmelser om kännbar varningsmärkning**

De tekniska specifikationerna för kännbar varningsmärkning skall uppfylla ISO-standard 11683 (1997 års utgåva) om kännbar varningsmärkning, 'Förpackningar – Kännbar varningssymbol – Fordringar'."

---

**KOMMISSIONENS DIREKTIV 2000/33/EG**

av den 25 april 2000

**om anpassning till tekniska framsteg för tjugosjunde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (\*)**

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT  
DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen<sup>(1)</sup>, senast ändrat genom Europaparlamentets och rådets direktiv 1999/33/EG<sup>(2)</sup>, särskilt artikel 28 i detta, och

av följande skäl:

- (1) I bilaga V till direktiv 67/548/EEG fastställs metoderna för bestämning av ämnens och preparats fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet. Denna bilaga måste anpassas till tekniska framsteg.
- (2) I artikel 7.2 i direktiv 86/609/EEG<sup>(3)</sup> om tillnärmning av medlemsstaternas lagar och andra författningar om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål föreskrivs följande: "Ett försök skall inte genomföras om det avsedda syftet kan uppnås med hjälp av någon annan vetenskapligt tillfredsställande metod som inte inbegriper användning av djur men ter sig rimlig och praktiskt genomförbar."
- (3) Kommissionen har för avsikt att i bilaga V till direktiv 67/548/EEG införa alternativa testmetoder som inte inbegriper användning av djur för att dessa metoder skall kunna användas för att testa kemiska ämnen.
- (4) De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Kommittén för anpassning till teknisk utveckling av direktiven om avskaffandet av tekniska handelshinder för farliga ämnen och preparat.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

Texten i bilagorna 1 och 2 till detta direktiv skall läggas till i avsnitt B i bilaga V till direktiv 67/548/EEG.

*Artikel 2*

1. Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv senast den 1 oktober 2001 och skall genast underrätta kommissionen om detta.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

2. Medlemsstaterna skall till kommissionen överlämna texterna till de centrala bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv och en tabell där detta direktiv jämförs med de nationella bestämmelser som antagits.

*Artikel 3*Detta direktiv träder i kraft den tredje dagen efter det att det har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.*Artikel 4*

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 25 april 2000.

*På kommissionens vägnar*

Margot WALLSTRÖM

*Ledamot av kommissionen*

(\*) Antagen före den tjugosjätte anpassningen.

<sup>(1)</sup> EGT 196, 16.8.1967, s. 1.<sup>(2)</sup> EGT L 199, 30.7.1999, s. 57.<sup>(3)</sup> EGT L 358, 18.12.1986, s. 1.

## BILAGA I

## ”B.40. HUDKORROSIVITET

1 **METOD**1.1 **Inledning**

Europeiska centret för validering av alternativa provningsmetoder (ECVAM, Gemensamma forskningscentret, Europeiska kommissionen) har bedömt två *in vitro*-test för hudkorrosivitet – bestämning av transkutant elektriskt motstånd i rått hud (TER) och ett test där en modell av human hud används – som vetenskapligt validerade (1) (2) (3). Vid ECVAM-valideringsstudien påvisades att båda testerna gav tillförlitliga resultat när det gällde att skilja mellan kända korrosiva och icke-korrosiva ämnen. Med försöksprotokollet baserat på modell av human hud kunde man dessutom framgångsrikt skilja mellan olika grader av korrosivitet (kända starkt korrosiva ämnen, R35 och andra korrosiva ämnen, R34) (2). Föreliggande dokument innehåller beskrivningar och förfaranden för båda testerna. Valet av test för ett visst ändamål beror på användarens specifika krav och preferenser.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 **Definitioner**

HUDKORROSIVITET: förmågan hos ett testämne som har applicerats på huden att framkalla irreversibla vävnadsskador.

1.3 **Referensämnen**

Inga referensämnen har specificerats. Se dock punkterna 1.5.3.4 och 1.7.2.3.

1.4 **Princip för testmetoden – Bestämning av TER i rått hud**

Testämnet appliceras och får verka upp till 24 timmar på ytan av hudbitar från humant avlivade unga råttor. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att framkalla skador på hudens hornlager och störningar i den normala barriärfunktionen, vilket kan fastställas som en sänkning av hudens transkutana elektriska motstånd (TER) under ett tröskelvärde (5 k $\Omega$ ) (4) (5). Irriterande och icke-irriterande material framkallar ingen sänkning av TER under tröskelvärdet. För surfaktanter och neutrala organiska ämnen kan testförfarandet kompletteras med ett färgämnesbindningssteg (för definition, se hänvisning (6)) i syfte att minska antalet falska positiva resultat som ofta fås med dessa kemikalietyper (2) (7).

1.5 **Beskrivning av testmetoden – bestämning av TER i rått hud**1.5.1 *Djur*

För beredningen av hudbitar behövs unga råttor (20–23 dagar, Wistar eller motsvarande stam). Råttornas rygg- och flankhår avlägsnas omsorgsfullt med en liten pålsklippningsmaskin. Djuren tvättas genom omsorgsfull avtorkning och det hårlösa området dränks med antibiotikalösning (som kan innehålla t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol eller amfotericin i tillräcklig koncentration för att hindra bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika tre eller fyra dagar efter den första tvätten och måste därefter användas inom 3 dagar (djur som används för beredning av hudbitar får inte vara äldre än 31 dagar).

1.5.2 *Beredning av hudbitar*

Djuren avlivas på humant sätt. Rygg huden från varje djur tas tillvara och allt överskottsfett avlägsnas omsorgsfullt. Huden placeras över ändan av ett rör av PTFE (polytetrafluoroetylen) med epidermisytan mot röret. En O-ring av gummi trycks över rörets ända för att hålla hudbiten på plats och överskottshud trimmas bort. Rörets och O-ringens mått framgår av figur 1. Därefter förseglas O-ringen omsorgsfullt till PTFE-röret med paraffin. Röret stöds av en fjäderklämma innanför en receptorkammare som innehåller magnesiumsulfatlösning (154 mM) (figur 2).

1.5.3 *Testförfarande*1.5.3.1 *Applicering av testämne*

Testämnen i vätskeform (150  $\mu$ l) appliceras på epidermisytan inuti röret (figur 2). Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela epidermisytan täcks. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150  $\mu$ l) på det fasta ämnet och röret omskakas varsamt. Testämnet bör ha maximal kontakt med huden. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30 °C så att testämnet smälter. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulat eller pulver.

Varje testämne appliceras på tre hudbitar. Testämnet får verka 24 timmar (se även 1.5.3.4) och avlägsnas därefter genom sköljning med kranvattenstråle (upp till 30 °C). Sköljningen bör pågå till dess att inget ämne längre fås bort. Testämne som har fastnat i röret kan sköljas bort med varmt vatten (cirka 30 °C).

### 1.5.3.2 TER-mätningar

För TER-mätningen används en LCR-mätare för lågspänning och växelström (t.ex. AIM 401, AIM 6401 eller motsvarande). För att sänka hudens ytspänning före motståndsmätningen tillförs etanol (70%) i tillräcklig mängd för att täcka epidermisytan. Etanolen får verka i några sekunder och hålls sedan ur röret. Därefter behandlas vävnaden med 3 ml magnesiumsulfatlösning (154 mM). För motståndsmätningen ( $k\Omega$ /hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 2). Elektrodernas mått och elektrodslängden under krokodilklämman framgår av figur 1. Den inre (tjocka) elektrodslämmen hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrodslängden inne i magnesiumsulfatlösningen hålls konstant. Den yttre (tunna) elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten skall hållas konstant (figur 1) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet.

Observera att om det uppmätta motståndsvärdet överstiger ett så högt värde som 20  $k\Omega$  kan detta bero på att hudbitens epidermisyta är täckt av testämne. För att få bort ämnet kan man t.ex. sluta till PTFE-röret med tummen (som bör skyddas med handske) och skaka om röret i cirka 10 sekunder, hålla ut magnesiumsulfatlösningen och upprepa mätningen med ny magnesiumsulfatlösning.

De resulterande medelvärdena är godtagbara om samtidiga positiva och negativa kontrollvärden faller inom det godkända området för metoden. I tabellen nedan anges förslag till kontrollämnen samt motsvarande godkända motståndintervall för den beskrivna metoden och utrustningen.

Kontroll	Ämne	Motståndintervall ( $k\Omega$ )
Positiv	10 M saltsyra (36 %)	0,5-1,0
Negativ	Destillerat vatten	10-25

### 1.5.3.3 Modifierat förfarande för surfaktanter och neutrala organiska ämnen

Om testämnet är en surfaktant eller neutralt organiskt ämne och TER-värdet är lägre eller lika med 5  $k\Omega$  kan falska positiva resultat sällas ut genom bestämning av färgämnespenetrationen i vävnaderna (2).

#### 1.5.3.3.1 Applicering och avlägsnande av färgämne (Sulforhodamine B)

Efter den första behandlingen med testämne appliceras 150  $\mu$ l 10-procentig (vikt i volym) lösning av färgämnet i destillerat vatten på epidermisytan av alla hudbitar. Lösningen får verka i 2 timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle under cirka 10 sekunder. Hudbitarna tas försiktigt bort från PTFE-röret och varje hudbit placeras i en burk (t.ex. en 20 ml scintillationsburk i glas) som innehåller avjoniserat vatten (8 ml). Burkarna omskakas varsamt under 5 minuter för att avlägsna ytterligare överskott (obundet färgämne). Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentig (vikt i volym) natriumdodekylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60 °C. Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs. Den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21 °C (relativ centrifugalkraft  $\sim$  175). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (t.ex. 1 ml + 4 ml) med 30-procentig (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mätes vid cirka 565 nm.

#### 1.5.3.3.2 Beräkning av färgämneshalten

Färgämneshalten per hudbit beräknas utifrån OD-värdena (färgämnets molära extinktionskoefficient vid 565 nm =  $8,7 \times 10^4$ ; molekylvikt = 580). Färgämneshalten bestäms för varje hudbit och därefter beräknas en medelhalt för alla hudbitarna. Resultaten är godtagbara om samtidiga kontrollvärden faller inom de godkända intervallen för metoden. I tabellen nedan ges förslag på godtagbara intervall för kontrollämnens färgämneshalt för den beskrivna metoden och utrustningen.

Kontroll	Ämne	Intervall för färgämneshalten (µg/bit)
Positiv	10 M saltsyra (36%)	40-100
Negativ	Destillerat vatten	15-35

#### 1.5.3.4 Tilläggsinformation

Det är också möjligt att låta testämnen verka på hudbitarna under kortare tid (t.ex. 2 timmar) i syfte att identifiera ämnen som är starkt korrosiva. Det visade sig dock vid valideringsstudien att TER-bestämning efter 2 timmars kemikaliepåverkan gav överdrivna resultat avseende flera kemikaliers korrosivitetspotential (2), trots att en korrekt identifiering av korrosiva och icke-korrosiva kemikalier kunde göras efter 24 timmars verkningsstid.

Testutrustningens egenskaper och mått samt det använda testförfarandet kan påverka de uppmätta TER-värdena. Korrosivitetströskeln på 5 kΩ härleddes från data som erhållits med den specifika utrustning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Om försöket utförs under betydligt annorlunda förhållanden kan avvikande tröskel- och kontrollvärden erhållas. Det rekommenderas därför att metoden och motståndets tröskelvärde kalibreras genom testning av en serie referensstandarder som valts ut bland de kemikalier som använts i valideringsstudien (3).

#### 1.6 Princip för testmetoden – bestämning med modell av human hud

Testämnet appliceras och får verka upp till 4 timmar på ytan av en tredimensionell modell av human hud som består av rekonstruerad epidermis med funktionellt hornlager. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att efter fastställda exponeringsperioder framkalla en sänkning av cellernas viabilitet (vilket kan fastställas t.ex. med MTT-reduktionsbestämning) under definierade tröskelvärden. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret (genom diffusion eller erosion) och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celledöd i underliggande cellskikt.

#### 1.7 Beskrivning av testmetoden – bestämning med modell av human hud

##### 1.7.1 Modeller av human hud

Modeller av human hud kan härröra från olika källor men måste uppfylla vissa kriterier. Modellen måste ha ett funktionellt hornlager med ett underliggande lager levande celler och hornlagrets barriärfunktion måste vara tillräcklig. Tillräcklig barriärfunktion kan påvisas genom demonstration av hudmodellens beständighet vad gäller cytotoxicitet. Detta görs genom att applicera ämnen som veterligen är cytotoxiska för celler men som normalt inte passerar hornlagret. Man måste kunna påvisa att hudmodellen ger reproducerbara resultat under definierade försöksförhållanden.

Hudmodellens levande celler måste ha tillräcklig viabilitet för att det skall uppstå en skillnad mellan resultatet för positivt och negativt kontrollämne. Cellernas viabilitet (t.ex. uppmätt genom MTT-reduktion, dvs. ett OD-värde) efter exponering för det negativa kontrollämnet måste falla inom godtagbara gränser för den berörda modellen. Likaså måste cellernas viabilitetsvärden för det positiva kontrollämnet (i förhållande till värdena för det negativa kontrollämnet) falla inom fastställda gränser. Det viktigaste kriteriet är att den förutsägbarhetsmodell som används måste ha påvisats uppfylla internationella valideringsstandarder (2).

##### 1.7.2 Testförfarande

###### 1.7.2.1 Applicering av testämne

Ämnen i vätskeform måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka hudens yta (minst 25 µl/cm<sup>2</sup>). Ämnen i fast form måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka huden och därefter måste ämnet fuktas för att säkerställa god kontakt med huden. I vissa fall måste ämnen i fast form pulveriseras före appliceringen. Appliceringsmetoden måste bevisligen vara lämplig för ett stort antal olika kemikalietyper (2). I slutet av exponeringsperioden skall testämnet omsorgsfullt tvättas bort från hudytan med saltlösning.

###### 1.7.2.2 Mätning av cellernas viabilitet

Cellernas viabilitet kan mätas med valfri validerad metod. Den oftast använda bestämningsmetoden är MTT-reduktion, som har visat sig ge exakta och reproducerbara resultat i olika laboratorier (2). Hudbitarna får ligga 3 timmar i en MTT-lösning (0,3 mg/ml) vid 20–28°C. Den utfällda blå formazanprodukten extraheras med lösningsmedel och formazanhalten mäts genom OD-bestämning vid en våglängd mellan 545 och 595 nm.

### 1.7.2.3 Tilläggsinformation

Den hudmodell som används och det exakta protokollet för exponeringstid, tvättningsförfaranden och dylika faktorer har stor inverkan på resultaten avseende cellernas viabilitet. Det rekommenderas att metoden och förutsägbarhetsmodellen kalibreras genom testning av en serie referensstandarder som väljs ut bland de kemikalier som användes i ECVAM-valideringsstudien (3). Ett avgörande kriterium är att metoden bevisligen är reproducerbar inom och mellan laboratorier för ett stort antal olika kemikalier, i enlighet med internationella standarder. Metoden bör minst uppfylla de fastställda kriterierna för vetenskaplig validitet (2) och resultaten från en sådan valideringsstudie måste publiceras i en kollegialt granskad vetenskaplig tidskrift.

## 2 DATA

### 2.1 Hantering av resultaten

#### 2.1.1 TER i rått hud

Motståndsvärden ( $k\Omega$ ) för testämnet, positiva och negativa kontrollämnen samt eventuella standardreferenskemikalier skall rapporteras i tabellform, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och den resulterande klassificeringen.

#### 2.1.2 Bestämning med modell av human hud

OD-värden och beräknade värden för cellernas procentuella viabilitet för testämnet, positiva och negativa kontrollämnen samt eventuella standardreferenskemikalier skall rapporteras i tabellform, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och den resulterande klassificeringen.

### 2.2 Utvärdering och tolkning av resultaten

#### 2.2.1 TER i rått hud

Om TER-medelvärdet som fås för testämnet är högre än  $5 k\Omega$  är testämnet icke-korrosivt. Om TER-värdet är lägre eller lika med  $5 k\Omega$  (och det inte gäller en surfaktant eller neutralt organiskt ämne) är testämnet korrosivt.

För surfaktanter eller neutrala organiska ämnen som ger TER-värden lägre eller lika med  $5 k\Omega$  kan testförfarandet kompletteras med färgämnespenetrering. Om medelvärdet för hudbitarnas färgämneshalt är större eller lika med motsvarande värde i den positiva kontroll som samtidigt utförs med 36 % HCl är testämnet sant positivt och därmed även korrosivt. Om medelvärdet för hudbitarnas färgämneshalt är lägre än motsvarande värde i den positiva kontrollen är testämnet falskt positivt och därmed icke-korrosivt.

#### 2.2.2 Bestämning med modell av human hud

Ett negativt OD-kontrollvärde betyder 100 % viabilitet för cellerna och därför kan de OD-värden som fås för vart och ett prov användas för att beräkna en procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen. Innan metoden kan valideras måste det viabilitetsgränsvärde som skiljer korrosiva testämnen från icke-korrosiva (eller som skiljer mellan olika grader av korrosivitet) definieras på ett klart sätt i förutsägbarhetsmodellen, och vid påföljande valideringsstudie måste påvisas att gränsvärdet är lämpligt (2).

## 3 RAPPORTERING

### Testrapport

Testrapporten måste innehålla minst följande information:

#### Testämne

- identifierande data, fysikalisk natur och i tillämpliga fall fysikalkemiska egenskaper. Motsvarande information bör lämnas för eventuella referensämnen.

#### Försöksförhållanden

- Detaljerade uppgifter om det testförfarande som har använts.
- Beskrivning av och motivering för eventuella modifieringar.

*Resultat*

- Tabelluppställning med testämnets motståndsvärden (TER-bestämning) eller cellernas procentuella viabilitet (bestämning med modell av human hud), positiva och negativa kontroller och eventuella standardreferenskemikalier, inbegripet data för replikat eller upprepade försök och medelvärden.
- Beskrivning av eventuella andra observerade verkningar.

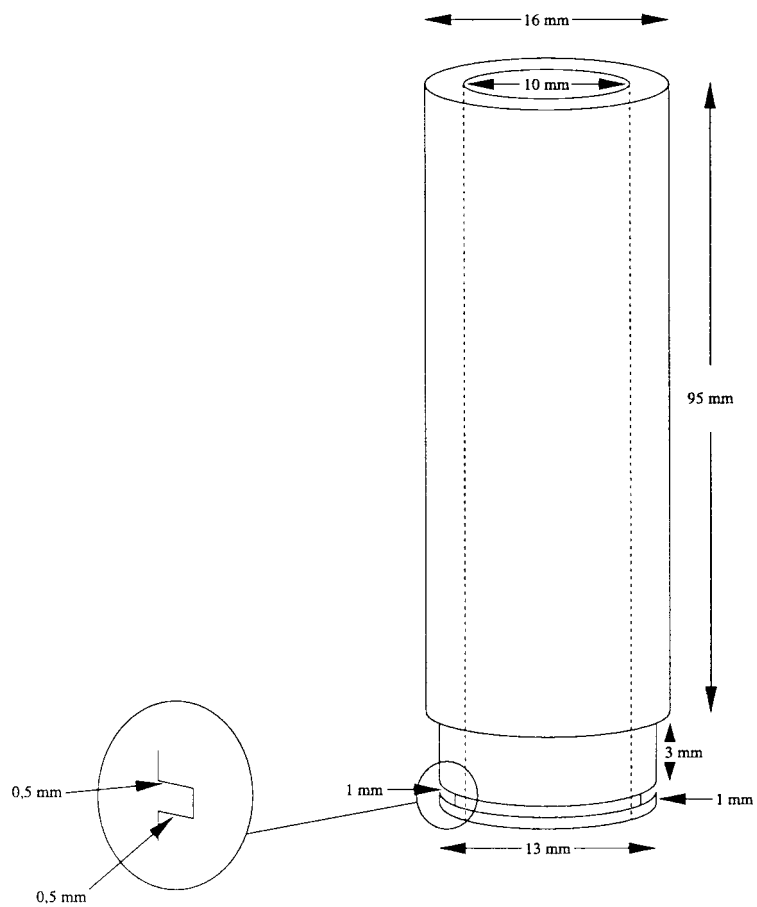
*Diskussion om resultaten**Slutsatser***4 HÄNVISNINGAR**

- (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., Ponc, 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.

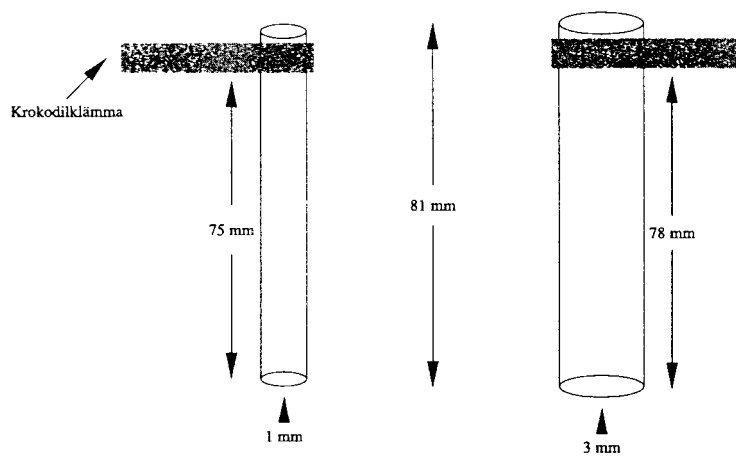


Figur 1

## PTFE-rörets mått

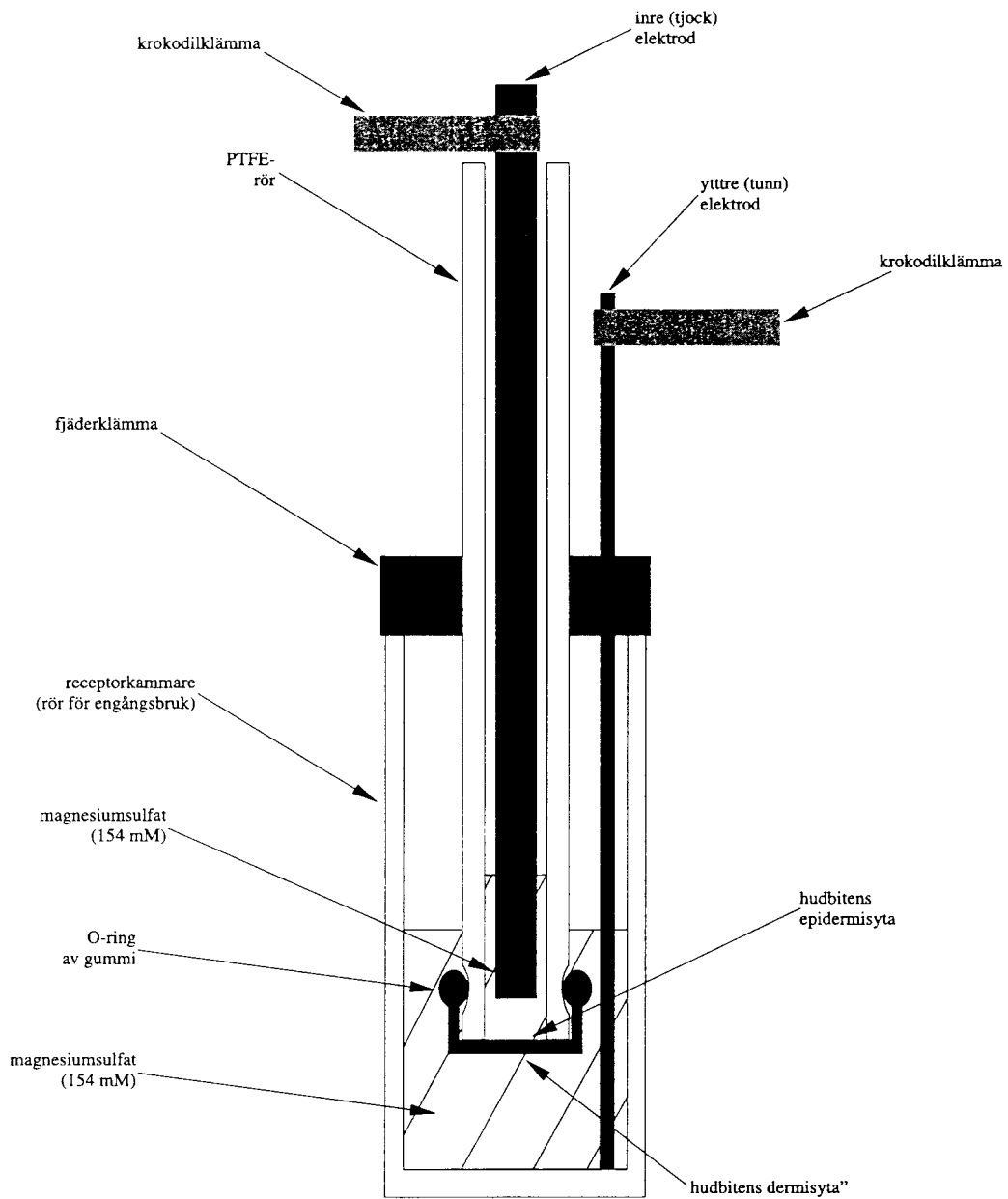


## Elektrodens mått



Figur 2

## Utrustning för bestämning av TER i råttthud



## BILAGA II

"B.41. FOTOTOXICITET – 3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*1. **METOD**1.1 **Inledning**

Fototoxicitet definieras såsom toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

Den information som erhållits från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* kan användas för att identifiera den fototoxiska potentialen hos ett testämne, dvs. huruvida testämnet kan ge upphov till skador eller inte i kombination med exponering för UV-strålning och synligt ljus.

Den toxikologiska slutpunkten för *in vitro*-testet består av fastställandet av fototoxicitet som framkallas genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, och därför kan testet användas för att identifiera både föreningar som är fototoxiska *in vivo* efter systemisk applicering och fördelning på huden, och föreningar som har fotoirriterande egenskaper efter applicering på hudens yta.

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* utvecklades och validerades inom ramen för ett gemensamt EU/COLIPA-projekt 1992–1997 (1) (2) (3) i syfte att få fram ett adekvat *in vitro*-alternativ till de olika *in vivo*-tester som var i bruk. Ett OECD-arbetsmöte lämnade 1996 rekommendationer om en sekventiell *in vitro*-testmetod för bedömning av fototoxicitet (4).

Resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* jämfördes med akuta fototoxicitets- och fotoirritationsverknings *in vivo* hos djur och människor, och testet har visat sig ge utmärkt förutsägbarhet vad gäller dessa verkningar. Avsikten med testet är inte att förutsäga andra skadliga verkningar som kan uppstå genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, t.ex. fotogenotoxicitet, fotoallergi och fotokarcinogenitet, även om många kemikalier med sådana specifika egenskaper reagerar positivt vid 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*. Testet är inte heller avsett att användas för bedömning av fototoxisk potential.

En sekventiell metod för testning av kemikaliers fototoxicitet presenteras i tillägget.

1.2 **Definitioner**

**Strålning:** Intensiteten hos ultraviolett (UV) eller synligt ljus som når en yta, uttryckt i  $W/m^2$  eller  $mW/cm^2$ .

**Ljusdos:** Den mängd (= intensitet  $\times$  tid) ultraviolett (UV) eller synlig strålning som når en yta, uttryckt i Joule (=  $W \times s$ ) per ytenhet, t.ex.  $J/m^2$  eller  $J/cm^2$ .

**UV-ljusets våglängdsområden:** CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) rekommenderar följande uppdelning: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) och UVC (100–280 nm). Även andra uppdelningar förekommer – gränsen mellan UVB och UVA sätts ofta vid 320 nm och UVA kan uppdelas i UV-A1 och UV-A2 med en gräns vid cirka 340 nm.

**Cellviabilitet:** En parameter för att mäta en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. upptag av det vitala färgämnet neutralrött i cellernas lysosomer). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet celler och deras vitalitet.

**Relativ cellviabilitet:** Cellviabiliteten uttryckt i förhållande till negativa kontroller (med lösningsmedel) som har tagits fortlöpande under hela testförloppet (+ UV eller – UV), utan behandling med testkemikalie.

**Förutsägbarhetsmodell:** En algoritm som används för att omvandla resultaten från ett toxicitetstest till förutsägelse av toxisk potential. I föreliggande testriktlinjer kan PIF och MPE användas för att omvandla resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* till en förutsägelse av fototoxisk potential.

**PIF (fotoirritationsfaktor):** En faktor som fås genom att jämföra två cytotoxiska koncentrationer ( $EC_{50}$ ) av testkemikalien som ger samma effekt i frånvaro (–UV) respektive närvaro (+UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

**MPE (Mean Photo Effect):** Ett nytt mått som har härletts från matematisk analys av den fullständiga formen hos två koncentrations-responskurvor som erhållits i frånvaro (–UV) respektive närvaro (+UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

**Fototoxicitet:** Akut toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

**Fotoirritation:** Ett underbegrepp av termen 'fototoxicitet'. Begreppet används endast för att beskriva sådana fototoxiska reaktioner som uppstår i huden efter kemikalieexponering (på huden eller oralt) och som alltid leder till icke-specifika cellskador (reaktioner av typen solbrännskador).

**Fotoallergi:** En förvärvad immunologisk reaktivitet som inte uppkommer vid en första behandling med kemikalie och ljus, och som behöver en induktionsperiod på en eller två veckor innan hudens reaktionsbenägenhet kan påvisas.

**Fotogenotoxicitet:** Genotoxisk respons som observeras med en genetisk slutpunkt. Denna framkallas efter att cellerna har exponerats för en icke-genotoxisk dos av UV/synligt ljus och en icke-genotoxisk kemikalie.

**Fotokarcinogenitet:** Karcinogenitet som induceras genom upprepad behandling med ljus och kemikalie. Termen 'foto-co-karcinogenes' står för att en kemikalie förstärker UV-inducerad tumorigenes.

### 1.3 Referensämnen

För upprättandet av 3T3 NRU-fototoxicitetstest rekommenderas, utöver användning av den positiva kontrollkemikalien klorpromazin som vid varje bestämning bör testas parallellt, att referenskemikalierna väljs ut ur den uppsättning kemikalier som användes i de laboratorier som deltog i provningarna för det aktuella testet (1) (3) (13).

### 1.4 Bakgrund

Många typer av kemikalier har rapporterats orsaka fototoxiska verkningar (5) (6) (7) (8). Dessa kemikaliers enda gemensamma egenskap är förmågan att absorbera ljusenergi inom solljusets våglängdsområde. Enligt fotokemins första lag (Grotthaus-Drapers lag) är tillräcklig absorption av ljuskvanta förutsättningen för en fotoreaktion. Innan man planerar biologisk testning av en kemikalie enligt de aktuella restriktlinjerna bör man därför fastställa den berörda kemikalies absorptionspektrum avseende UV/synligt ljus (t.ex. enligt OECD:s restriktlinjer 101). Om den molära extinktions- eller absorptionskoefficienten ligger under  $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  har kemikalien ingen fotoreaktiv potential och behöver inte testas med 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* eller annat biologiskt test av skadliga fotokemiska effekter (bilaga 1).

### 1.5 Princip för testmetoden

Man har identifierat fyra mekanismer som kan resultera i fototoxisk respons genom att ljus absorberas av en (kemisk) kromofor (7). Alla fyra mekanismer leder till cellskador. Därför bygger 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* på en jämförelse av cytotoxiciteten hos en kemikalie när den testas exponerad respektive icke-exponerad för en icke-cytotoxisk dos av UVA/synligt ljus. Cytotoxiciteten uttrycks då som en koncentrationsberoende minskning av upptaget av det vitala färgämnet neutralrött (NR) (9) 24 timmar efter behandling med testkemikalien och påföljande bestrålning.

Balb/c 3T3-celler hålls i kultur under 24 timmar för monolayerbildning. Två 96-hålsplattor per testkemikalie förinkuberas i en timme med åtta olika koncentrationer av kemikalien. Därefter exponeras den ena av de två plattorna för en icke-cytotoxisk dos ( $5 \text{ J/cm}^2$  UVA) av UVA/synligt ljus (+UV-provning) medan den andra plattan hålls i mörker (-UV-provning). Sedan byter man ut båda plattornas behandlingsmedium mot kulturmedium (närlösning) och efter ytterligare 24 timmars inkubering bestäms cellviabiliteten med neutralrött-upptag (NRU) i 3 timmar. Den relativa cellviabiliteten, uttryckt som en procentandel jämfört med obehandlade negativa kontrollprov, beräknas för envar av de åtta testkoncentrationerna. Därefter uppskattas den fototoxiska potentialen genom jämförelse av den koncentrationsrespons som erhålls i närvaro (+UV) och i frånvaro (-UV) av strålning, i regel på nivån  $EC_{50}$ , dvs. den koncentration som minskar cellviabiliteten med 50 % jämfört med de obehandlade kontrollproverna.

### 1.6 Kvalitetskriterier

**Cellernas UVA-känslighet, historiska data:** Cellerna skall regelbundet kontrolleras avseende UVA-känslighet. Cellerna sås ut med samma täthet som i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*, bestrålas följande dag med UVA-doser på  $1-9 \text{ J/cm}^2$  och en dag senare bestäms cellernas viabilitet med NRU-metoden. Cellerna uppfyller kvalitetskriterierna om deras viabilitet efter bestrålning med  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA är minst 80 % av viabiliteten hos obestrålade kontrollceller. Vid den högsta UVA-dosen på  $9 \text{ J/cm}^2$  bör viabiliteten vara minst 50 % av viabiliteten hos obestrålade kontrollceller. Kontrollen bör upprepas cirka var tionde cellpassage.

**Negativkontrollcellernas UVA-känslighet, aktuell test:** Testet uppfyller kvalitetskriterierna om +UVA-försökets negativkontrollceller (celler i EBSS – Earl's Balanced Salt Solution) med eller utan 1 % dimetylsulfoxid (DMSO) eller 1 % etanol (EtOH) har en viabilitet som är minst 80 % av viabiliteten hos obestrålade celler i likadan lösning i det parallella mörkerexperimentet (-UVA).

**Negativkontrollcellernas viabilitet:** Den absoluta optiska densiteten ( $OD_{540\text{ NRU}}$ ) uppmätt för negativkontrollcellernas NR-extrakt indikerar om de  $1 \times 10^4$  celler som har såtts ut per hål har vuxit med normal dubblingstid under de två dagar bestämningen pågår. Ett test uppfyller kriterierna för godkännande om medelvärdet för  $OD_{540\text{ NRU}}$  hos obehandlade kontrollceller är  $\geq 0,2$ .

**Positivkontrollämne:** Varje 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* skall åtföljas av parallelltest av en känd fototoxisk kemikalie. Vid EU/COLIPA-valideringsstudien användes klotpromazin (CPZ) som positivkontrollämne och denna kemikalie kan därför rekommenderas. För CPZ som hade testats enligt standardprotokollet i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* definierades följande kriterier för godkännande: CPZ bestrålat (+UVA):  $EC_{50} = 0,1-2,0 \mu\text{g/ml}$ , CPZ obestrålat (-UVA):  $EC_{50} = 7,0-90,0 \mu\text{g/ml}$ . Fotoirritationsfaktorn (PIF), dvs. brytpunkten för  $EC_{50}$ , bör vara minst 6.

I stället för CPZ kan även andra kända fototoxiska kemikalier, lämpliga för den kemiska klass eller de löslighetsegenskaper som gäller för testkemikalien, användas vid de parallella positivkontrollerna. I sådant fall skall historiska data användas som hjälp för att definiera de värdeområden för  $EC_{50}$  och för PIF eller MPE som används som kriterier för godkännande.

## 1.7 Beskrivning av testmetoden

### 1.7.1 Förberedelser

#### 1.7.1.1 Celler

För valideringsstudien användes en etablerad musfibroblastcellinje – Balb/c 3T3, klon 31 – antingen från ATCC eller från ECACC, som därför kan rekommenderas. Andra celler eller cellinjer kan med framgång användas med samma testprotokoll, förutsatt att odlingsbetingelserna anpassas till cellernas specifika behov. Motsvarigheten måste demonstreras.

Cellerna skall regelbundet kontrolleras med avseende på mykoplasmaförening och får endast användas när resultatet från en sådan kontroll är godtagbart.

Eftersom cellernas UVA-känslighet kan öka med antalet passager skall Balb/c 3T3-celler med lägsta möjliga passagenummer användas, helst under 100. Det är viktigt att Balb/c 3T3-cellernas UVA-känslighet kontrolleras enligt det kvalitetskontrollförfarande som beskrivs i dessa riktlinjer.

#### 1.7.1.2 Media och odlingsbetingelser

Lämpliga näringslösningar och inkuberingsbetingelser bör användas för vanliga cellpassager och under testförfarandet. Balb/c 3T3-celler DMEM-kompletteras med 10% serum från nyfödd kalv, 4 mM glutamin, penicillin och streptomycin samt inkubering i fuktig atmosfär vid 37°C och 7,5%  $\text{CO}_2$ . Det är särskilt viktigt att man med cellodlingsbetingelserna kan säkerställa en cellcykeltid inom det normala historiska intervallet för de celler eller den cellinje som används.

#### 1.7.1.3 Beredning av kulturer

Celler från djupfrysta stamkulturer sås ut i näringslösningen i lämplig täthet och subkultiveras minst en gång innan de används i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*.

För fototoxicitetstestet sås testcellerna ut i näringslösningen med sådan täthet att odlingarna inte växer samman före avslutat test, dvs. när cellviabiliteten bestäms 48 timmar efter utsådden. För Balb/c 3T3-celler som odlas på 96-hålsplattor rekommenderas tätheten  $1 \times 10^4$  celler per hål.

För varje testkemikalie sås celler ut på samma sätt på två separata 96-hålsplattor som därefter parallellt används genom hela testförfarandet under identiska odlingsförhållanden, med undantag av den tidsperiod då den ena plattan bestrålas (+UVA/synligt ljus) och den andra hålls i mörker (-UVA/synligt ljus).

#### 1.7.1.4 Metabolisk aktivering

Metaboliserande system är ett allmänt krav för alla *in vitro*-test som används för förutsägelse av genotoxisk och karcinogen potential, men när det gäller fototoxicitet känner man än så länge inte till någon kemikalie där metabolisk omvandling krävs för att kemikalien skall fungera fototoxiskt *in vivo* eller *in vitro*. Det är därför varken nödvändigt eller vetenskapligt motiverat att det aktuella testet genomförs med ett system som har metabolisk aktivering.

### 1.7.1.5 Testkemikalie – beredning

Testkemikalierna måste ha beretts omedelbart före användningen, om man inte med stöd av stabilitetsdata kan visa att kemikalierna är lagringsbeständiga. Om det är sannolikt att kemikalien har hög sönderfallshastighet under inverkan av ljus måste beredningen genomföras under rött ljus.

Testkemikalierna skall lösas upp i buffrade saltlösningar, t.ex. EBSS (Earl's Balanced Salt Solution) eller PBS (fosfatbuffrad saltlösning). Saltlösningarna får inte innehålla proteinkomponenter eller ljusabsorberande pH-indikatorfärger som kan störa bestrålningsresultatet.

Testkemikalier med begränsad vattenlöslighet skall lösas upp i lämpligt lösningsmedel i en koncentration som är 100 gånger högre än den önskade och därefter spädas ut i förhållandet 1:100 med den buffrade saltlösningen. Om lösningsmedel används måste detta förekomma i en konstant volymkoncentration på 1 % i alla odlingar, dvs. både i de negativa kontrollerna och i alla koncentrationer av testkemikalien.

Som lösningsmedel rekommenderas dimetylsulfoxid (DMSO) och etanol (EtOH). Andra lösningsmedel med låg cytotoxicitet (t.ex. aceton) kan vara lämpliga men måste utvärderas omsorgsfullt med avseende på specifika egenskaper, t.ex. reaktionsbenägenhet med testkemikalien, dämpning av den fototoxiska verkan eller benägenhet att fånga upp radikaler.

Vid behov kan man använda Vortex-blandning, ultraljudsbehandling eller uppvärmning till 37°C för att underlätta upplösningen.

### 1.7.1.6 UV-bestrålning – beredning

*Ljuskälla:* Lämplig ljuskälla i kombination med lämplig filtrering är den viktigaste faktorn vid testning av fototoxicitet. I regel förknippas UVA och de synliga våglängdsområdena med fotosensibilisering (7) (10), medan UVB har mindre relevans och är direkt mycket cytotoxisk – cytotoxiciteten ökar 1000-faldigt när våglängden minskar från 313 till 280 nm (11). Kriterierna för valet av lämplig ljuskälla bör inbegripa det grundläggande kravet om att ljuskällan emitterar våglängder som absorberas av testkemikalien och att ljusdosen (den dos som uppnås inom skälig tid) är tillräcklig för detektering av kända fotosensibilisatorer. Dessutom får de våglängder och doser som används inte vara otillbörligt skadliga för testsystemet, vilket inbegriper värmeemission (infraröda området).

Det optimala är att använda simulerat solljus från en solsimulator. I solsimulatorer används både xenonbåglampor och (dopade) kvicksilver-metallhalidbåglampor. Fördelen med de senare är att de emitterar mindre värme och är billigare, men ljusets likhet med solljus är inte perfekt. Alla solsimulatorer emitterar betydande mängder UVB och bör därför förses med lämpliga filter för att dämpa de mycket cytotoxiska UVB-våglängderna.

Det strålningsspektrum som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* måste vara praktiskt taget fritt från UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Man har offentliggjort ett exempel på den spektrala strålningsdistributionen från den filtrerade solsimulator som användes i valideringsstudien för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (3).

*Dosimetri:* Ljusets (strålningens) intensitet skall före varje fototoxicitetstest rutinmässigt kontrolleras med hjälp av en bredbands UV-mätare. UV-mätaren måste ha kalibrerats mot källan och dess prestanda bör kontrolleras. För detta ändamål rekommenderas användning av en referensmätare, dvs. en annan, identiskt kalibrerad UV-mätare av samma typ. Helst skall man även då och då använda en spektrometriometer för att mäta den spektrala strålningen från den filtrerade ljuskällan och för att kontrollera UV-mätarnas kalibrering. Användningen av sådana instrument är dock mycket krävande och förutsätter tillbörligt utbildad personal.

I valideringsstudien konstaterades att en dos på 5 J/cm<sup>2</sup> (UVA) inte var cytotoxisk för Balb/c 3T3-celler men ändå tillräckligt stark för att excitera även svagt fototoxiska kemikalier. För att uppnå 5 J/cm<sup>2</sup> inom en tidsperiod på 50 minuter måste strålningen ställas in på 1,666 mW/cm<sup>2</sup>. Om en annan cellinje eller en annan ljuskälla används måste UVA-dosen eventuellt justeras i någon mån. Som kriterium skall då gälla att strålningen inte får vara skadlig för cellerna men tillräcklig för detektering av vanliga fototoxiska ämnen. Tiden för ljusexponeringen beräknas på följande sätt:

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

### 1.7.2 Försöksförhållanden

Testkemikaliens maximikoncentration får inte överskrida 100 µg/ml, eftersom alla fototoxiska kemikalier detekteras vid lägre koncentrationer. Vid högre koncentrationer ökar återigen förekomsten av falska positiva utslag (13). Den högsta koncentrationen av testkemikalien bör ha ett tillfredsställande pH-värde (pH-område: 6,5–7,8).

Koncentrationsområdena för en kemikalie som skall testas i närvaro (+UVA) respektive i frånvaro (-UVA) av ljus skall först fastställas på lämpligt sätt i förberedande försök. Koncentrationsseriens område och intervall skall justeras på sådant sätt att försöksdata ger tillräckligt underlag för koncentrations-responskurvorna. Koncentrationsserierna skall vara geometriska (dvs. ha konstant utspädningsfaktor).

### 1.7.3 Testförfarande <sup>(1)</sup>

#### 1.7.3.1 Dag 1

Bered en cellsuspension på  $1 \times 10^5$  celler/ml i näringslösning och dosera 100 µl ren näringslösning i de perifera hålen av en 96-håls TC-mikroplatta (= blindprov). Dosera 100 µl cellsuspension med  $1 \times 10^5$  celler/ml i de återstående hålen (=  $1 \times 10^4$  celler/hål). Det behövs två plattor per kemikalie: en för bestämning av cytotoxicitet (-UVA) och en för bestämning av fotocytotoxicitet (+UVA).

Inkubera cellerna i 24 timmar (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C) för att få bildning av halvkonfluent monolayer. Denna inkuberingsperiod är tillräcklig för cellernas återhämtning och vidhäftning samt exponentiell tillväxt.

#### 1.7.3.2 Dag 2

Dekantera näringslösningen från cellerna efter inkuberingen och tvätta två gånger med 150 µl EBSS/PBS per hål. Tillsätt 100 µl EBSS/PBS som innehåller lämplig koncentration av testkemikalien eller rent lösningsmedel (negativ kontroll). Använd 8 olika koncentrationer av testkemikalien. Inkubera cellerna med testkemikalie i mörker i 60 minuter (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

Utför bestämningens +UVA-del genom att bestråla cellerna vid rumstemperatur i 50 minuter genom 96-hålsplattans lock med 1,7 mW/cm<sup>2</sup> UVA (= 5 J/cm<sup>2</sup>). Ventilera med en fläkt för att förebygga kondensbildning under locket. Håll parallellplattorna (-UVA) vid rumstemperatur i en mörk låda i 50 minuter (=UVA-exponeringstiden).

Dekantera testlösningen och tvätta två gånger med 150 µl EBSS/PBS. Ersätt EBSS/PBS med näringslösning och inkubera (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C) över natten (18–22 timmar).

#### 1.7.3.3 Dag 3

Utvärdering med mikroskop

Undersök cellerna i faskontrastmikroskop. Notera alla ändringar i cellernas morfologi till följd av cytologiska verkningar av testkemikalien. Denna undersökning rekommenderas som kontroll i syfte att utesluta experimentella fel men resultatet används inte för utvärdering av cytotoxicitet eller fototoxicitet.

Test med upptagning av neutralrött

Tvätta cellerna med 150 µl föruppvärmd EBSS/PBS. Avlägsna tvättlösningen genom att klappa försiktigt. Tillsätt 100 µl NR-medium och inkubera vid 37°C, i fuktig atmosfär med 7,5% CO<sub>2</sub> i 3 timmar.

Avlägsna NR-mediet efter inkuberingen och tvätta cellerna med 150 µl EBSS/PBS. Dekantera och absorbera EBSS/PBS helt och hållet. (Alternativt: centrifugera omvänd platta.)

Tillsätt exakt 150 µl NR-desorptionslösning (färsk lösning av etanol och ättiksyra).

Skaka plattan snabbt i en skakmaskin i 10 minuter för att extrahera NR ur cellerna och få ett homogent NR-extrakt.

Mät NR-extraktets optiska densitet vid 540 nm i en spektrofotometer och använd blindproven som referens. Spara data i lämpligt filformat (t.ex. ASCII) för efterföljande analys.

<sup>(1)</sup> Närmare detaljer finns i hänvisning 12.

## 2. DATA

### 2.1 Kvalitet och kvantitet hos data

Erhållna data bör ge möjlighet till meningsfull analys av den koncentrationsberoende respons som konstateras i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus. Om cytotoxicitet detekteras skall både koncentrationsområdet och intervallet för enskilda koncentrationer anpassas så att försöksdata kan sammanställas till en kurva. Eftersom en testkemikalie kan vara icke-cytotoxisk upp till den definierade gränskoncentrationen på 100 µg/ml i mörkerförsöket (-UVA) men mycket cytotoxisk när den bestrålas (+UVA), måste man eventuellt använda koncentrationsområden av olika storleksordningar för de två delarna av försöket i syfte att få adekvat kvalitet på data. Om kemikalien inte uppvisar cytotoxicitet i någondera försöksdelen (-UVA och +UVA) är det tillräckligt att testa med stort intervall mellan enskilda doser upp till den högsta koncentrationen.

Klart positiva resultat behöver inte verifieras genom upprepade försök. Dessutom behöver klart negativa resultat inte verifieras förutsatt att testkemikalien har testats vid tillräckligt höga koncentrationer. I sådana fall är det tillräckligt med ett huvudförsök som stöds av ett eller flera preliminära försök för bestämning av område.

Om man får testresultat som kommer nära förutsägarhetsmodellens gräns måste resultaten verifieras genom upprepat test.

Om upprepat test behövs kan det vara viktigt att variera försöksförhållandena för att få ett tydligt resultat. En nyckelvariabel är då beredningen av testkemikalilösningarna. Därför kan variationer i beredningen (hjälpmedel, sönderdelning, ultraljudsbehandling) ha mycket stor relevans vid en upprepning. Alternativt kan man överväga variation av inkuberingstiden före bestrålningen. En kortare bestrålningstid kan ha betydelse när det gäller kemikalier som inte är stabila i vatten.

### 2.2 Hantering av resultaten

När detta är möjligt fastställs den koncentration av testkemikalien som motsvarar en minskning på 50% av cellernas NR-upptag (EC<sub>50</sub>). Detta kan genomföras med hjälp av valfri icke-linjär regressionsprocedur (helst en Hill-funktion eller logistisk regressionsanalys) för koncentrations-responsdata, eller med hjälp av andra anpassningsprocedurer (14). Innan ett EC<sub>50</sub>-värde används för ytterligare beräkningar skall anpassningens kvalitet kontrolleras på tillbörligt sätt. Alternativt kan man använda grafiska anpassningsmetoder för beräkning av EC<sub>50</sub>. I sådant fall rekommenderas användning av sannolikhetspapper (x-skala: log, y-skala: probit) eftersom funktionen för koncentrationsrespons efter denna omvandling i många fall blir nästan linjär.

### 2.3 Utvärdering av resultaten (förutsägarhetsmodeller)

#### 2.3.1 Förutsägarhetsmodell version 1: Fotoirritationsfaktor (PIF)

Om man som resultat får fullständiga koncentrations-responskurvor både i närvaro (+UVA) och i frånvaro (-UVA) av ljus, kan en fotoirritationsfaktor (PIF) beräknas med hjälp av följande formel:

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

En PIF-faktor under 5 tyder på att kemikalien inte har fototoxisk potential, medan en PIF-faktor  $\geq 5$  tyder på fototoxisk potential.

Om en kemikalie endast är cytotoxisk när den testas med +UVA men inte är cytotoxisk när den testas med -UVA kan PIF inte beräknas, även om detta är ett resultat som tyder på fototoxisk potential. I ett sådant fall kan man beräkna ett '>PIF'-värde om (-UV)-cytotoxicitetstestet genomförs upp till den högsta testkoncentrationen (C<sub>max</sub>) och detta värde används för beräkning av '>PIF':

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

Om endast '>PIF' kan erhållas tyder varje värde större än 1 på fototoxisk potential.

Om varken EC<sub>50</sub> (-UV) eller EC<sub>50</sub> (+UV) kan beräknas på grund av att en kemikalie inte uppvisar någon cytotoxicitet upp till den högsta testkoncentrationen, tyder detta på avsaknad av fototoxisk potential. I sådana fall används ett formellt värde 'PIF=\*1' för att karakterisera resultatet:

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



Om endast 'PIF = \* 1' kan erhållas tyder detta på avsaknad av fototoxisk potential.

I fall (b) och fall (c) skall resultaten från 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* omsorgsfullt beaktas vid förutsägelser av den fototoxiska potentialen.

#### 2.3.2 Förutsägbarhetsmodell version 2: MPE (Mean-Photo-Effect)

Alternativt kan en ny version av modellen för förutsägbarhet av den fototoxiska potentialen tillämpas. Denna nya version har tagits fram med hjälp av data från EU/COLIPA-valideringsstudien (15) och har testats under blindförhållanden i en efterföljande studie om *in vitro*-fototoxiciteten hos UV-filterkemikalier (13). Med stöd av denna modell kan man överkomma PIF-modellens begränsningar i fall där EC<sub>50</sub> inte kan erhållas. Modellen stöder sig på MPE, ett mått som grundar sig på jämförelse av de fullständiga koncentrations-responskurvorna. MPE-modellen tillämpas med hjälp av ett datorprogram som har utvecklats speciellt för ändamålet vid Humboldt-universitetet (Berlin, Tyskland) och som kan rekvireras kostnadsfritt.

#### 2.4 Tolkning av resultaten

Ett positivt resultat i 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (PIF ≥ 5 eller MPE ≥ 0,1) indikerar att testämnet har fototoxisk potential. Om resultatet fås med koncentrationer under 10 µg/ml är det sannolikt att testkemikalien också fungerar som fototoxin under olika exponeringsförhållanden *in vivo*. Om positivt resultat endast fås med den högsta testkoncentrationen på 100 µg/ml kan det vara nödvändigt med ytterligare överväganden för bedömningen av risk eller fototoxisk potential. Sådana kan inbegripa data om penetrering, absorption och möjlig ackumulering av kemikalien i huden, eller testning av kemikalien i ett bekräftande alternativt test, t.ex. med modell av human hud *in vitro*.

Ett negativt resultat från 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* (PIF < 5 eller MPE < 0,1) indikerar att testämnet under gällande förhållanden inte är fototoxiskt för de odlade däggdjurscellerna. I fall där kemikalien kan testas upp till den högsta koncentrationen på 100 µg/ml indikerar ett negativt resultat att kemikalien saknar fototoxisk potential och att fototoxicitet *in vivo* kan anses osannolik. I fall där identisk koncentrations-toxicitetsrespons (EC<sub>50</sub>+UV och EC<sub>50</sub>-UV) fås vid lägre koncentrationer skall data tolkas på samma sätt. Om däremot ingen fototoxicitet kan påvisas (+UV och -UV) och om begränsad vattenlöslighet medför att man inte kan få koncentrationer på över 100 µg/ml, måste testämnets lämplighet för bestämningen ifrågasättas och bekräftande testning bör övervägas (t.ex. med modell av human hud *in vitro*, hudmodell *ex vivo* eller *in vivo*-test).

### 3 RAPPORTERING

#### Testrapport

Testrapporten skall innehålla följande uppgifter:

##### Testkemikalier:

- identifieringsdata och CAS-nr (i mån av tillgänglighet),
- fysikalisk form och renhetsgrad,
- fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien,
- stabilitet och fotostabilitet (i mån av tillgänglighet).

##### Lösningsmedel:

- motivering för valet av lösningsmedel,
- testkemikaliers löslighet i det valda lösningsmedlet,
- procenthalten lösningsmedel i behandlingsmediet (EBSS eller PBS).

##### Celler:

- typ av celler och deras källa,
- frånvaron av mykoplasma,
- antalet cellpassager (i mån av tillgänglighet),
- cellernas UVA-känslighet, bestämd med den bestrålningsutrustning som använts för 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro*.

##### Försöksförhållanden (a) – inkubering före och efter behandlingen:

- näringslösningens (kulturmediets) typ och sammansättning,
- inkuberingsförhållanden (CO<sub>2</sub>-koncentration, temperatur, fuktighet),
- inkuberings varaktighet (förbehandling, efterbehandling).

*Försöksförhållanden (b) – behandling med kemikalien:*

- motivering för valet av de koncentrationer av testkemikalien som använts i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UV/synligt ljus,
- om testkemikalien är begränsat löslig och om cytotoxicitet inte föreligger, motivering för den högsta koncentration som testats,
- typ av och sammansättning hos behandlingsmediet (buffrad saltlösning),
- kemikaliebehandlingsens varaktighet.

*Försöksförhållanden (c) – bestrålning:*

- motivering för valet av den ljuskälla som använts,
- ljuskällans spektrala strålningsegenskaper,
- transmissions- och absorptionssegenskaper hos filter som använts,
- radiometerns egenskaper och närmare uppgifter om kalibreringen,
- avstånd mellan ljuskälla och testsystem,
- UVA-bestrålning på detta avstånd, uttryckt i  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ,
- varaktigheten hos bestrålningen med UV/synligt ljus,
- UVA-dos (bestrålning  $\times$  tid), uttryckt i  $\text{J}/\text{cm}^2$ ,
- temperatur som använts för cellodlingarna under bestrålningen och för cellodlingar som parallellt hållits i mörker.

*Försöksförhållanden (d) – NRU test:*

- sammansättning hos NR-mediet,
- NR-inkuberingens varaktighet,
- inkuberingsförhållanden ( $\text{CO}_2$ -koncentration, temperatur, fuktighet),
- NR-extraktionsbetingelser (extraktionsmedel, varaktighet),
- våglängd som använts för spektrofotometrisk avläsning av optisk densitet för NR,
- annan våglängd (referens), om sådan har använts,
- spektrofotometerblindprovets innehåll, om blindprov har använts.

*Resultat:*

- cellviabilitet som erhållits vid varje koncentration av testkemikalien, uttryckt som genomsnittlig procentuell andel jämfört med kontrollernas viabilitet,
- koncentrations-responskurvor (testkemikaliekoncentration i förhållande till relativ cellviabilitet), som erhållits i parallella försök med +UVA och -UVA,
- dataanalys av koncentrations-responskurvorna: om möjligt beräkning av  $\text{EC}_{50}$  (+UVA) och  $\text{EC}_{50}$  (-UVA),
- jämförelse av de två koncentrations-responskurvorna som erhållits i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus, antingen genom beräkning av PIF eller genom beräkning av MPE,
- klassificering av fototoxisk potential,
- kriterier för godkännande av testet (a) – parallell negativkontroll:
  - absolut viabilitet (optisk densitet hos NR-extrakt) hos bestrålade och obestrålade celler,
  - historiska data för negativkontroll, medelvärde och standardavvikelse.
- kriterier för godkännande av testet (b) – parallell positivkontroll:
  - $\text{EC}_{50}$  (+UVA) och  $\text{EC}_{50}$  (-UVA) och PIF för positivkontrollkemikalie,
  - historiska data för positivkontrollkemikalie:  $\text{EC}_{50}$  (+UVA) och  $\text{EC}_{50}$  (-UVA) och PIF, medelvärde och standardavvikelse

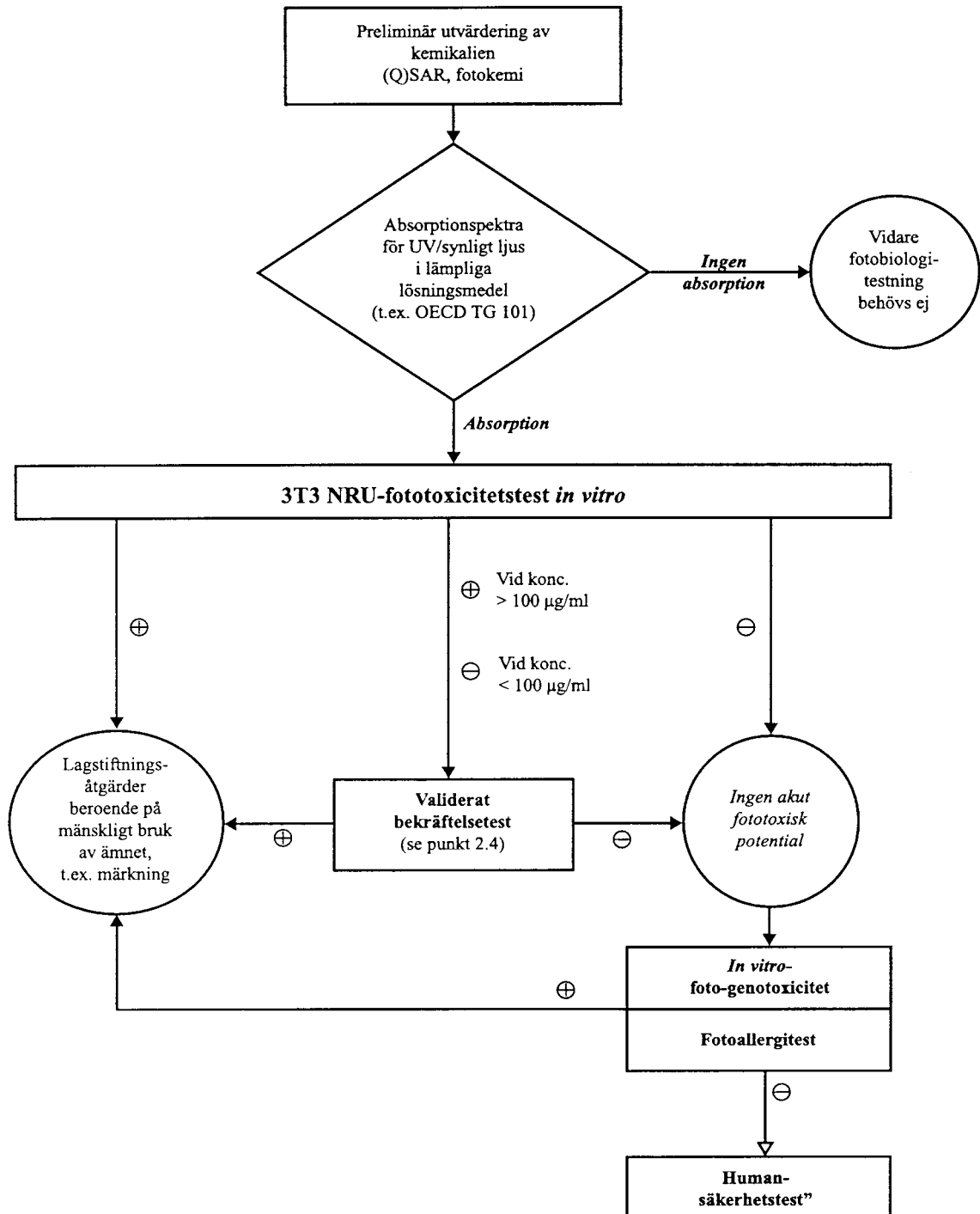
*Diskussion av resultaten**Slutsatser*

## 4. HÄNVISNINGAR

- (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., Clothier, 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.

## Tillägg

## Rollen hos 3T3 NRU-fototoxicitetstest i en sekventiell metod för testning av kemikaliers fototoxicitet



## II

(Rättsakter vilkas publicering inte är obligatorisk)

## KOMMISSIONEN

## KOMMISSIONENS BESLUT

av den 19 maj 2000

**om rättelse av direktiv 98/98/EG om anpassning till tekniska framsteg för tjugofemte gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen**

[delgivet med nr K(2000) 1333]

(Text av betydelse för EES)

(2000/368/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT  
DETTA BESLUT

utveckling av direktiven om avskaffande av tekniska handelshinder för farliga ämnen och preparat.

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen<sup>(1)</sup>, senast ändrat genom Europaparlamentets och rådets direktiv 1999/33/EG<sup>(2)</sup>, särskilt artikel 28 i detta, och

Artikel 1

Bilaga 4 till direktiv 98/98/EG skall ersättas med bilagan till detta beslut.

av följande skäl:

Artikel 2

(1) I bilaga VI till direktiv 67/548/EEG finns riktlinjer för klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen och preparat. Bilaga VI ändrades senast genom bilaga 4 till direktiv 98/98/EG<sup>(3)</sup>. Punkterna 3.2.3, 3.2.8, 6.2 och 8 i bilaga 4 till direktiv 98/98/EG är ofullständiga. Det är därför nödvändigt att korrigera bilaga 4 till direktiv 98/98/EG.

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 19 maj 2000.

(2) Det åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från Kommittén för anpassning till teknisk

På kommissionens vägnar  
Margot WALLSTRÖM  
Ledamot av kommissionen

<sup>(1)</sup> EGT 196, 16.8.1967, s. 1.

<sup>(2)</sup> EGT L 199, 30.7.1999, s. 57.

<sup>(3)</sup> EGT L 355, 30.12.1998, s. 1.

## BILAGA

## "BILAGA 4

- 1.6 De data som krävs för klassificering och märkning av ämnen kan erhållas på följande sätt:
- a) Ämnen för vilka den information som anges i bilaga VII erfordras: De flesta data som är nödvändiga för klassificering och märkning framgår av baskraven. Denna klassificering och märkning skall om nödvändigt ses över när ytterligare information blir tillgänglig (bilaga VIII)
  - b) Andra ämnen (t.ex. de som avses i avsnitt 1.5 ovan): De data som krävs för klassificering och märkning kan, om nödvändigt, erhållas från ett antal olika källor, t.ex. resultat från tidigare undersökningar, information som erfordras i enlighet med internationella regler om transport av farliga ämnen, information inhämtad från referenslitteratur eller genom praktisk erfarenhet. Resultaten av validerade strukturaktivitets-samband samt expertbedömningar kan också beaktas i förekommande fall.

De data som krävs för klassificering och märkning av preparat kan erhållas på följande sätt:

- a) Fysikalisk-kemiska data: Genom användning av de metoder som beskrivs i bilaga V. För gasformiga preparat kan en beräkningsmetod användas för brandfarliga och oxiderande egenskaper (se kapitel 9).
- b) Data om hälsoeffekter:
  - Genom användning av de metoder som anges i bilaga V, och genom användning av den konventionella metod som beskrivs i artikel 3.5 a-i i direktiv 88/379/EEG eller, vad gäller R 65, genom tillämpning av reglerna i 3.2.3.
  - Vid utvärdering av cancerframkallande, mutagena och reproduktionstoxiska egenskaper skall emellertid den konventionella metod som beskrivs i artikel 3.5 j-q i direktiv 88/379/EEG användas.

*Anmärkning om genomförande av djurförsök*

Djurförsök som genomförs för att fastställa experimentella data omfattas av direktiv 86/609/EEG om skydd av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål.

1.7.2 *Användning av vägledande kriterier för ämnen*

De vägledande kriterier som anges i denna bilaga är direkt tillämpliga när data har erhållits genom testmetoder som är jämförbara med dem som beskrivs i bilaga V. I annat fall måste tillgängliga data bedömas genom att de använda testmetoderna jämförs med dem i bilaga V och med de regler för fastställande av lämplig klassificering och märkning som anges i denna bilaga

I vissa fall kan det råda tvekan om hur kriterierna skall tillämpas, särskilt när dessa kräver användning av en expertbedömning. I sådana fall skall tillverkaren, distributören eller importören preliminärt klassificera och märka ämnet på grundval av en kompetent persons bedömning av dokumentationen.

Utan att det påverkar tillämpningen av artikel 6, kan, när ovannämnda förfarande har följts och det finns risk för inkomsekvens, ett förslag lämnas in om att införa den preliminära klassificering i bilaga I. Förslaget skall riktas till en av medlemsstaterna och omfatta relevanta vetenskapliga data (se även punkt 4.1).

Ett liknande förfarande kan tillämpas när det framkommer information som ger anledning att betvivla att en befintlig uppgift i bilaga I är korrekt.

2.2.2.1 *Anmärkning om peroxider*

Vad beträffar explosiva egenskaper skall organiska peroxider eller preparat innehållande organiska peroxider, oavsett i vilken form de släpps ut på marknaden, klassificeras i enlighet med kriterierna i punkt 2.2.1 på grundval av tester som genomförts enligt de metoder som anges i bilaga V.

Vad beträffar oxiderande egenskaper kan de befintliga metoderna i bilaga V inte användas för organiska peroxider.

Organiska peroxider som inte redan klassificerats som explosiva skall på grundval av sin struktur (t.ex. R-O-O-H; R<sub>1</sub>-O-O-R<sub>2</sub>) klassificeras som farliga.

Preparat som inte redan klassificerats som explosiva skall klassificeras genom användning av den beräkningsmetod som visas i punkt 9.5, vilken grundas på den procentuella andelen aktivt syre.

Alla organiska peroxider eller preparat innehållande organiska peroxider som inte redan klassificerats som explosiva skall klassificeras som oxiderande om de innehåller

- mer än 5 hairsp;% organiska peroxider, eller
- mer än 0,5% tillgängligt syre från de organiska peroxiderna och mer än 5 hairsp;% väteperoxid.

### 3.2.3 Hälsoskadlig

Ämnen och preparat skall klassificeras som hälsoskadliga och tilldelas symbolen 'Xn' samt farobeteckningen 'hälsoskadlig' i enlighet med kriterierna nedan. Riskfraser skall tilldelas i enlighet med följande kriterier:

#### R 22 Farligt vid förtäring

Akut toxicitet:

- LD<sub>50</sub> oral, råtta:  $200 < LD_{50} \leq 2\ 000$  mg/kg
- Särskiljande dos, oral, råtta, 50 mg/kg: 100 % överlevnad men uppenbar toxicitet
- Mindre än 100 % överlevnad vid 500 mg/kg, (oral, råtta), enligt metoden för särskiljande dos. Se bedömningstabell i testmetod B1 (a) i bilaga V.

#### R 21 Farligt vid hudkontakt

Akut toxicitet:

- LD<sub>50</sub> dermal, råtta eller kanin:  $400 < LD_{50} \leq 2\ 000$  mg/kg.

#### R 20 Farligt vid inandning

Akut toxicitet:

- LC<sub>50</sub> inhalation, råtta, för aerosoler eller partiklar:  $1 < LC_{50} \leq 5$  mg/liter/4 tim.
- LC<sub>50</sub> inhalation, råtta, för gaser eller ångor:  $2 < LC_{50} \leq 20$  mg/liter/4 tim.

#### R 65 Farligt: Kan ge lungskador vid förtäring

Flytande ämnen och preparat som på grund av låg viskositet utgör en fara för människor vid aspiration:

- a) Ämnen och preparat innehållande alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten med en koncentration på 10 hairsp;% eller mer, och som antingen har
  - en flödestid understigande 30 sekunder, uppmätt i en 3 mm ISO-bägare enligt ISO 2431, eller
  - en kinematisk viskositet understigande  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s vid 40°C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104/3105, eller
  - en kinematisk viskositet understigande  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s vid 40°C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

*Anmärkning:* Det bör påpekas att ämnen och preparat som uppfyller ovan angivna kriterier inte behöver klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning överstigande 33 mN/m vid 25°C uppmätt med du Nuoy-tensiometer eller med de metoder som visas i bilaga V del A.5.

- b) Ämnen och preparat som enligt praktisk erfarenhet är skadliga för människor.

#### R 40 Möjlig risk för bestående hälsoskador

- Starka belägg för att andra bestående skador än de effekter som anges i kapitel 4 sannolikt kan uppstå vid en enda exponering, i allmänhet i ovan nämnda dosintervall.

För att ange administrerings-/exponeringssätt skall någon av följande kombinationer användas: 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 Risk för allvarliga hälsoskador vid långvarig exponering

- Allvarlig skada (tydlig funktionell störning eller morfologisk förändring med toxikologisk signifikans) orsakas sannolikt vid upprepad eller långvarig exponering via relevant tillförselväg.

Ämnen och preparat klassificeras åtminstone som hälsoskadliga när dessa effekter observeras vid doser av följande storleksordning:

- Oral, råttor  $\leq 50$  mg/kg (kroppsvikt)/dag.
- Dermal, råttor eller kanin  $\leq 100$  mg/kg (kroppsvikt)/dag.
- Inhalation, råttor  $\leq 0,25$  mg/l, 6 tim/dag.

Dessa riktvärden kan tillämpas direkt när allvarliga skador har observerats i ett subkroniskt (90-dagars) toxicitetstest. Vid tolkning av resultat från ett subakut (28-dagars) toxicitetstest bör dessa siffror ökas ungefär trefaldigt. Om ett test av kronisk (2-års) toxicitet är tillgängligt bör det göras en bedömning från fall till fall. Om resultat från undersökningar av olika varaktighet är tillgängliga bör resultaten från den undersökning som varat längst normalt sett användas.

För att ange administrations-/exponeringssätt skall någon av följande kombinationer användas: 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 Kommentarer beträffande flyktiga ämnen

För vissa ämnen med hög mättnadskoncentration för ånga kan det finnas belägg för effekter som ger anledning till oro. Det är möjligt att sådana ämnen undgår klassificering enligt kriterierna för hälsoeffekter i denna vägledning (3.2.3) eller att de inte omfattas av punkt 3.2.8. Om det finns relevanta belägg för att sådana ämnen utgör en risk vid normal hantering och användning kan det emellertid, efter bedömning av varje enskilt fall, vara nödvändigt att klassificera dem i bilaga I.

### 3.2.6.1 Hudinflammation

Följande riskfras skall tilldelas i enlighet med de fastställda kriterierna:

#### R 38 Irriterar huden

- Ämnen och preparat som ger upphov till en signifikant inflammation i huden som varar i minst 24 timmar efter en exponeringstid på upp till fyra timmar vid testning av hudirritation på kanin i enlighet med den metod som beskrivs i bilaga V.

Inflammation är signifikant

- a) om medelvärdet, beräknat för samtliga testade djur, är 2 eller mer med avseende på antingen hudrodnad och skorpbildning eller ödembildning, eller
- b) om testet i bilaga V genomförs på tre djur och antingen inflammation och skorpbildning eller ödembildning, motsvarande ett medelvärde på 2 eller mer, beräknat för varje enskilt djur, noteras hos minst två djur.

I båda fallen skall medelvärdet beräknas utifrån samtliga värden vid var och en av avläsningstiderna (24, 48 och 72 timmar).



Hudinflammationen är också signifikant om den består hos minst två djur i slutet av observationstiden. Särskilda verkningar, t.ex. hyperplasi, fjällning, missfärgning, sprickor, sårskorpor och håravfall, bör beaktas.

Relevanta data kan också inhämtas genom icke-akuta djurförsök (se kommentarerna till R 48 i punkt 2 d). Dessa data anses signifikanta om de noterade effekterna är jämförbara med dem som beskrivs ovan.

- Ämnen och preparat som vid kortvarig, långvarig eller upprepad kontakt orsakar en signifikant inflammation i huden, baserat på praktiska erfarenheter på människor.
- Organiska peroxider, utom när det finns belägg för att riskfrasen inte är tillämplig.

*Parestesi:* Parestesi som uppkommer hos människor vid hudkontakt med pyretroidbaserade bekämpningsmedel anses inte vara en sådan irriterande effekt som motiverar klassificering som Xi; R 38. S-fras S 24 bör emellertid användas för ämnen som kan ge denna effekt.

### 3.2.8 *Andra toxikologiska egenskaper*

Ytterligare riskfraser skall tilldelas ämnen och preparat som klassificerats i överensstämmelse med punkterna 2.2.1 till 3.2.7 ovan eller kapitlen 4 och 5, och detta i enlighet med följande kriterier (grundade på den erfarenhet som förvärvats vid sammanställning av bilaga I).

R 29 Utvecklar giftig gas vid kontakt med vatten

För ämnen och preparat som vid kontakt med vatten eller fuktig luft utvecklar giftiga/mycket giftiga gaser i potentiellt farliga mängder, t.ex. aluminiumfosfid och fosforpentasulfid.

R 31 Utvecklar giftig gas vid kontakt med syra

För ämnen och preparat som reagerar med syror och utvecklar giftiga gaser i farliga mängder, t.ex. natriumhypoklorit, bariumpolysulfid. För ämnen som används av allmänheten är det mer lämpligt att använda S 50 (Blanda inte med ... [anges av tillverkaren]).

R 32 Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra

För ämnen och preparat som vid reaktion med syror utvecklar mycket giftiga gaser i farliga mängder, t.ex. salter av vätecyanid, natriumazid. När det gäller ämnen som används av allmänheten är det mer lämpligt att använda S 50 (Blanda inte med ... [anges av tillverkaren]).

R 33 Kan ansamlas i kroppen och ge skador

För ämnen och preparat innehållande sådana ämnen, som troligen kan ansamlas i människokroppen och därför möjligen kan ge upphov till skador. De är dock inte tillräckliga för att berättiga användningen av R 48.

R 64 Kan skada spädbarn under amningsperioden

För ämnen och preparat som tas upp av kvinnor och som kan påverka amningen eller förekomma i modersmjölk (även metaboliter) i mängder som är tillräckliga för att ge anledning till oro när det gäller ett ammat barns hälsa.

För kommentarer om användning av R 64 (och i vissa fall R 33), se punkt 4.2.3.3.

R 66 Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor

För ämnen och preparat vilka bör uppmärksammas på grund av att de vid hudkontakt kan orsaka uttorkning, fjällning eller sprickbildning, men som inte uppfyller kriterierna för R 38:

grundat antingen på

- praktiska erfarenheter vid normal hantering och användning, eller
- relevanta belägg avseende deras förväntade effekter på huden.

Se även punkterna 1.6 och 1.7.

#### R 67 Ångor kan göra att man blir dåsig och omtöcknad

För flyktiga ämnen och preparat innehållande sådana ämnen, som vid inandning ger tydliga symptom på funktionsnedsättningar i centrala nervsystem och som inte redan är klassificerade med avseende på akut inhalationstoxicitet (R 20, R 23, R26, R 40/20, R 39/23 eller R 39/26).

Följande belägg kan användas:

- a) Data från djurförsök som visar på klara tecken på funktionsnedsättningar i centrala nervsystemet, exempelvis narkotiska effekter, letargi, bristande koordination (bl.a. förlust av upprättningsreflex) och ataxi, antingen
  - vid koncentrationer/exponeringstider som inte överstiger 20 mg/l/4 timmar, eller
  - när kvoten mellan den koncentration som ger upphov till effekter vid en exponeringstid  $\leq 4$  timmar och mättnadskoncentrationen för ånga vid 20°C är  $\leq 1/10$ .
- b) Praktisk erfarenhet av effekter på människor (t.ex. narkos, dåsighet, sänkt grad av uppmärksamhet, förlust av reflexer, bristande koordination, yrsel) från väldokumenterade rapporter vid exponeringsförhållanden som är jämförbara med dem som anges ovan för djur.

Se även punkterna 1.6 och 1.7.

Se punkt 2.2.6 för ytterligare riskfraser.

- 4.1.2 Om en tillverkare, distributör eller importör har tillgång till information som tyder på att ämnet bör klassificeras och märkas i enlighet med de kriterier som anges i punkterna 4.2.1, 4.2.2 eller 4.2.3 skall han preliminärt märka ämnet i enlighet med dessa kriterier, på grundval av en kompetent persons bedömning av dokumentationen.
- 4.1.3 Tillverkaren, distributören eller importören skall snarast möjligt lämna in en sammanfattning av all relevant information till en medlemsstat där ämnet släpps ut på marknaden. Sammanfattningen skall innehålla en bibliografi som upptar alla relevanta referenser, inklusive alla opublicerade uppgifter av betydelse
- 4.1.4 En tillverkare, distributör eller importör som har tillgång till nya uppgifter som är av betydelse för ett ämnes klassificering och märkning enligt kriterierna i punkterna 4.2.1, 4.2.2 eller 4.2.3, skall så snart som möjligt överlämna dessa uppgifter till en medlemsstat där ämnet släpps ut på marknaden

#### 5.2.2 *Andra miljöer än vattenmiljöer*

- 5.2.2.1 Ämnen skall klassificeras som miljöfarliga och tilldelas symbolen 'N', lämplig farobeteckning samt riskfraser i enlighet med följande kriterier:

R 54: Giftigt för växter

R 55: Giftigt för djur

R 56: Giftigt för markorganismer

R 57: Giftigt för bin

R 58: Kan orsaka skadliga långtidseffekter i miljön

Ämnen som kan medföra en omedelbar, långsiktig eller fördröjd fara för struktur och funktion hos andra naturliga ekosystem än de som anges i 5.2.1 ovan. Bedömningen skall grundas på tillgängliga data om ämnens egenskaper, persistens, potential för bioackumulering och förutsedda eller observerade uppträdande i miljön. Utförliga kriterier kommer att utarbetas senare.

- 5.2.2.2 Ämnen skall klassificeras som miljöfarliga och tilldelas symbolen 'N', lämplig farobeteckning samt riskfraser i enlighet med följande kriterier:

R 59: Farligt för ozonskiktet.

Ämnen som, på grundval av tillgängliga data om deras egenskaper och förutsedda eller observerade uppträdande i miljön, kan utgöra en fara för det stratosfäriska ozonskiktets struktur och funktion. Hit hör de ämnen som upptas i bilaga I till rådets förordning (EG) nr 3093/94 om ämnen som bryter ned ozonskiktet (EGT L 333, 22.12.1994, s. 1) och senare ändringar av denna förordning.

## 6.2 Skyddsfraser för ämnen och preparat

### S 1 Förvaras i låst utrymme

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga eller frätande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för sådana ämnen och preparat som nämns ovan, om de säljs till allmänheten.

### S 2 Förfaras oåtkomligt för barn

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för alla farliga ämnen och preparat som säljs till allmänheten, utom för sådana som endast klassificeras som farliga för miljön.

### S 3 Förvaras svalt

- Tillämpning:
  - Organiska peroxider
  - Andra farliga ämnen och preparat med kokpunkt  $\leq 40$  °C.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för organiska peroxider om inte S 47 används.
  - Rekommenderas för andra farliga ämnen och preparat med kokpunkt  $\leq 40$  °C.

### S 4 Förvaras avskilt från bostadsutrymmen

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga och giftiga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till mycket giftiga och giftiga ämnen och preparat när det är önskvärt att komplettera S 13; till exempel när det finns risker vid inandning och ämnet eller preparatet bör förvaras åtskilt från bostadsutrymmen. Skyddsfrasen syftar inte till att utesluta korrekt användning av ämnet eller preparatet i bostadsutrymmen.

### S 5 Förvara innehållet i ... (lämplig vätska anges av tillverkaren)

- Tillämpning:
  - Fasta ämnen och preparat som kan självantända.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall, t.ex. natrium, kalium eller vit fosfor.

### S 6 Förvaras i ... (inert gas anges av tillverkaren)

- Tillämpning:
  - Farliga ämnen och preparat som måste förvaras i inert atmosfär.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall, t.ex. vissa organiska metallföreningar.

**S 7 Förpackningen förvaras väl tillsluten**

- Tillämpning:
  - Organiska peroxider.
  - Ämnen och preparat som kan avge mycket giftiga, giftiga, hälsoskadliga eller extremt brandfarliga gaser.
  - Ämnen och beredningar som i kontakt med fukt avger extremt brandfarliga gaser.
  - Mycket brandfarliga fasta ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för organiska peroxider.
  - Rekommenderas för övriga fall som nämns ovan.

**S 8 Förpackningen förvaras torrt**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan reagera våldsamt med vatten.
  - Ämnen och preparat som vid kontakt med vatten utvecklar extremt brandfarliga gaser.
  - Ämnen och preparat som vid kontakt med vatten utvecklar mycket giftiga eller giftiga gaser.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till de tillämpningsområden som nämns ovan, när det är nödvändigt att förstärka de varningar som ges genom R 14, R 15 (i synnerhet) och R 29.

**S 9 Förpackningen förvaras på väl ventilerad plats**

- Tillämpning:
  - Flyktiga ämnen och preparat som kan avge mycket giftiga, giftiga eller hälsoskadliga gaser.
  - Extremt brandfarliga eller brandfarliga vätskor och extremt brandfarliga gaser.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för flyktiga ämnen och preparat som kan avge mycket giftiga, giftiga eller hälsoskadliga ångor.
  - Rekommenderas för extremt brandfarliga eller mycket brandfarliga vätskor eller extremt brandfarliga gaser.

**S 12 Förpackningen får inte tillslutas lufttätt**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan avge gaser eller ångor som kan spränga förpackningen
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till de speciella fall som nämns ovan.

**S 13 Förvaras åtskilt från livsmedel och djurfoder**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga och hälsoskadliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för sådana ämnen och preparat när de kan komma att användas av allmänheten.

**S 14 Förvaras åtskilt från ... (oförenliga ämnen anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Organiska peroxider.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för och normalt begränsad till peroxider. Kan dock komma till användning i särskilda fall när oförenliga egenskaper kan medföra särskilda risker.

**S 15 Får inte utsättas för värme**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan sönderfalla eller reagera spontant under inverkan av värme.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall, t.ex. monomerer, och skall inte tilldelas om någon av riskfraserna R 2, R 3 eller R 5 redan används.

**S 16 Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden**

- Tillämpning:
  - Extremt brandfarliga eller mycket brandfarliga vätskor och extremt brandfarliga gaser.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för de ämnen och preparat som nämns ovan, men skall inte tilldelas om någon av riskfraserna R 2, R 3, eller R 5 redan används.

**S 17 Förvaras åtskilt från brandfarliga ämnen**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan bilda explosiva eller självantändliga blandningar med brännbart material.
- Kriterier för användning:
  - För användning i speciella fall, t.ex. för att understryka R 8 och R 9.

**S 18 Förpackningen hanteras och öppnas försiktigt**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan ge upphov till övertryck i förpackningen.
  - Ämnen och preparat som kan bilda explosiva peroxider.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till de fall som nämns ovan när det finns risk för ögonskador och/eller när ämnena och preparaten kan komma att användas av allmänheten.

**S 20 Ät inte eller drick inte under hanteringen**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga och frätande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall (t.ex. arsenik och arsenikföreningar samt fluoracetater), särskilt när dessa kan komma att användas av allmänheten.

**S 21 Rök inte under hanteringen**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som bildar giftiga produkter vid förbränning.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall (t.ex. halogenerade föreningar).

**S 22 Undvik inandning av damm**

- Tillämpning:
  - Alla hälsofarliga fasta ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för sådana ämnen och preparat som nämns ovan vilka tilldelats R 42.
  - Rekommenderas för sådana ämnen och preparat som nämns ovan vilka levereras i en form som kan damma och för vilka hälsoriskerna vid inandning inte är kända.

**S 23 Undvik inandning av gas/rök/ånga/dimma (lämplig formulering anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Alla hälsofarliga vätske- eller gasformiga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för sådana ämnen och preparat som nämns ovan vilka tilldelats R 42.
  - Obligatorisk för ämnen och preparat avsedda för sprutning eller sprayning. Antingen S 38 eller S 51 måste tilldelas dessutom.
  - Rekommenderas när det är nödvändigt att fästa användarens uppmärksamhet på inandningsrisker som inte framgår av de tilldelade riskfraserna.

**S 24 Undvik kontakt med huden**

- Tillämpning:
  - Alla hälsoskadliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för alla ämnen och preparat som tilldelats R 43, om inte S 36 också anges.
  - Rekommenderas när det är nödvändigt att fästa användarens uppmärksamhet på hudkontaktrisker som inte framgår av de tilldelade riskfraserna (t.ex. parestesi). Kan emellertid också användas för att betona sådana riskfraser.

**S 25 Undvik kontakt med ögonen**

- Tillämpning:
  - Alla hälsoskadliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas när det är nödvändigt att fästa användarens uppmärksamhet på sådana risker vid kontakt med ögonen som inte framgår av de tilldelade riskfraserna. Kan emellertid också användas för att betona sådana riskfraser.
  - Rekommenderas för alla ämnen som tilldelats R 34, R 35, R 36 eller R 41 och som kan komma att användas av allmänheten.

**S 26 Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare**

- Tillämpning:
  - Frätande eller irriterande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för frätande ämnen och preparat och för sådana som tilldelats R 41.
  - Rekommenderas för irriterande ämnen och preparat som tilldelats R 36.

**S 27 Tag genast av alla nedstänkta kläder**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga eller frätande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för mycket giftiga ämnen och preparat som tilldelats R 27 och som kan komma att användas av allmänheten.
  - Rekommenderas för mycket giftiga ämnen och preparat som tilldelats R 27 och är avsedda för industriellt bruk. Denna skyddsfras skall emellertid inte användas om S 36 skall anges.
  - Rekommenderas för giftiga ämnen och preparat som tilldelats R 24 samt för frätande ämnen och preparat som kan komma att användas av allmänheten.

**S 28 Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket ... (anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga och frätande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för mycket giftiga ämnen och preparat
  - Rekommenderas för de andra ämnen och preparat som anges ovan, särskilt när det är lämpligt att skölja med en annan vätska än vatten.
  - Rekommenderas för frätande ämnen och preparat som kan komma att användas av allmänheten.

**S 29 Töm ej i avloppet**

- Tillämpning:
  - Extremt brandfarliga eller mycket brandfarliga vätskor som inte är blandbara med vatten.
  - Mycket giftiga och giftiga ämnen och preparat.
  - Miljöfarliga ämnen.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för miljöfarliga ämnen som tilldelats symbolen 'N', och som kan komma att användas av allmänheten, såvida de inte är avsedda att användas i avlopp.
  - Rekommenderas för andra ovan nämnda ämnen och preparat som kan komma att användas av allmänheten, såvida de inte är avsedda att användas i avlopp.

**S 30 Häll aldrig vatten på eller i produkten**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som reagerar våldsamt med vatten.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall (t.ex. svavelsyra) och kan användas, när det är lämpligt för att ge så tydlig information som möjligt, antingen för att understryka R 14 eller som ett alternativ till R 14.

**S 33 Vidtag åtgärder mot statisk elektricitet**

- Tillämpning:
  - Extremt eller mycket brandfarliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för ämnen och preparat som används inom industrin och som inte absorberar fukt. Används i praktiken aldrig för ämnen och preparat som släpps ut på marknaden för att användas av allmänheten.

**S 35 Produkt och förpackning skall oskadliggöras på säkert sätt**

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för ämnen och preparat för vilka det krävs särskild vägledning för att tillförsäkra att de bortskaffas på lämpligt sätt.

**S 36 Använd lämpliga skyddskläder**

- Tillämpning:
  - Organiska peroxider.
  - Mycket giftiga, giftiga eller hälsoskadliga ämnen och preparat
  - Frätande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för mycket giftiga och frätande ämnen och preparat.
  - Obligatorisk för de ämnen och preparat som tilldelats R 21 eller R 24.
  - Obligatorisk för cancerframkallande, mutagena och reproduktionstoxiska ämnen i kategori 3 om dessa verkningar inte uppkommer enbart vid inandning av ämnet eller preparatet.
  - Obligatorisk för organiska peroxider.
  - Rekommenderas för giftiga ämnen och preparat för vilka LD<sub>50</sub>-värdet (dermalt) inte är känt, men som troligen är giftiga vid hudkontakt.
  - Rekommenderas för ämnen och preparat som används inom industrin och som kan skada hälsan vid förlängd exponering.

**S 37 Använd lämpliga skyddshandskar**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga, hälsoskadliga eller frätande ämnen och preparat.
  - Organiska peroxider.
  - Ämnen och preparat som irriterar huden eller ger upphov till sensibilisering vid hudkontakt.



- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för mycket giftiga och frätande ämnen och preparat
  - Obligatorisk för ämnen och preparat som tilldelats antingen R 21, R 24 eller R 43.
  - Obligatorisk för cancerframkallande, mutagena och reproduktionstoxiska ämnen i kategori 3 om dessa verkningar inte uppkommer enbart vid inandning av ämnet eller preparatet
  - Obligatorisk för organiska peroxider.
  - Rekommenderas för giftiga ämnen och preparat för vilka LD<sub>50</sub>-värdet (dermalt) inte är känt men som troligen är hälsoskadliga vid hudkontakt.
  - Rekommenderas för ämnen och preparat som irriterar huden.

### **S 38 Använd lämpligt andningsskydd vid otillräcklig ventilation**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga eller giftiga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall som rör användandet av mycket giftiga eller giftiga ämnen och preparat inom industrin eller jordbruket.

### **S 39 Använd skyddsglasögon eller ansiktsskydd**

- Tillämpning:
  - Organiska peroxider.
  - Frätande ämnen och preparat, inklusive irriterande ämnen och preparat som kan ge upphov till allvarlig ögonskada.
  - Mycket giftiga och giftiga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för de ämnen och preparat vilka tilldelats R 34, R 35 eller R 41.
  - Obligatorisk för organiska peroxider.
  - Rekommenderas när det är nödvändigt att fästa användarens uppmärksamhet på sådana risker vid kontakt med ögon som inte framgår av de tilldelade riskfraserna.
  - Normalt begränsad till särskilda fall för mycket giftiga och giftiga ämnen och preparat, då det finns risk för stänk och det är troligt att de lätt absorberas genom huden.

### **S 40 Golv och förorenade föremål tvättas med ... (anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till de farliga ämnen och preparat för vilka vatten inte anses vara ett lämpligt rengöringsmedel (t.ex. där absorption med hjälp av pulverformigt material, användning av lösningsmedel etc. är nödvändig) och där det är viktigt av hälso- och/eller säkerhetsskäl att det ges en varning på etiketten.

### **S 41 Undvik inandning av rök vid brand eller explosion**

- Tillämpning:
  - Farliga ämnen och preparat som vid förbränning avger mycket giftiga eller giftiga gaser.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall.

**S 42 Använd lämpligt andningsskydd vid gasning/sprutning (specificeras av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat avsedda för sådan användning, men som kan riskera användarens hälsa och säkerhet om inte lämpliga försiktighetsåtgärder vidtas
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall.

**S 43 Vid brandsläckning använd ... (ange lämplig metod. Om vatten ökar risken, lägg till 'Använd aldrig vatten')**

- Tillämpning:
  - Extremt brandfarliga, mycket brandfarliga och brandfarliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för ämnen och preparat som i kontakt med vatten eller fuktig luft utvecklar extremt brandfarliga gaser.
  - Rekommenderas för extremt brandfarliga, mycket brandfarliga och brandfarliga ämnen och preparat, särskilt när de inte är blandbara med vatten.

**S 45 Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare (visa om möjligt etiketten)**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga ämnen och preparat.
  - Giftiga och frätande ämnen och preparat.
  - Ämnen och preparat som ger upphov till sensibilisering vid inandning.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för de ämnen och preparat som nämns ovan.

**S 46 Vid förtäring kontakta genast läkare och visa denna förpackning eller etiketten**

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat förutom de som är mycket giftiga, giftiga, frätande eller miljöfarliga.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för alla farliga ämnen och preparat som nämns ovan och som kan komma att användas av allmänheten, förutom då det inte finns några skäl att de är farliga att förtära, i synnerhet av barn.

**S 47 Förvaras vid en temperatur som inte överstiger ... °C (anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som blir instabila vid en viss temperatur.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall (t.ex. vissa organisk peroxider).

**S 48 Innehållet skall hållas fuktigt med ... (lämpligt material anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan bli mycket känsliga för gnistor, friktion eller stötar om de tillåts torka ut.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till speciella fall, t.ex. nitrocellulosa

**S 49 Förvaras endast i originalförpackningen**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som är känsliga för katalytisk sönderdelning.
- Kriterier för användning:
  - Ämnen och preparat som är känsliga för sönderdelning, t.ex. vissa organiska peroxider.

**S 50 Blanda inte med ... (anges av tillverkaren)**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan reagera med den angivna produkten och utveckla mycket giftiga eller giftiga gaser.
  - Organiska peroxider.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för ämnen och preparat som nämns ovan, vilka kan komma att användas av allmänheten, ner denna fras är ett bättre alternativ än R 31 eller R 32.
  - Obligatorisk för vissa peroxider som kan reagera våldsamt med acceleratorer eller promotorer.

**S 51 Sörj för god ventilation**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som kan avge eller är avsedda att avge ånga, damm, aerosol, rök, dimma, etc. och som medför risker vid inandning eller risk för brand eller explosion.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas när användningen av S 38 inte är lämplig. Särskilt viktig när sådana ämnen och preparat kan komma att användas av allmänheten.

**S 52 Olämpligt för användning inomhus vid behandling av stora ytor**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga, giftiga eller hälsoskadliga flyktiga ämnen och preparat som innehåller dessa ämnen.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas när hälsoskador kan orsakas av längre tids exponering för dessa ämnen på grund av att de avdunstar från stora behandlade ytor i bostäder eller andra avgränsade utrymmen inomhus där människor vistas.

**S 53 Undvik exponering – Begär specialinstruktioner före användning**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som är cancerframkallande, mutagena eller reproduktionstoxiska.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för de ämnen och preparat som nämns ovan vilka tilldelats minst en av följande R-fraser: R 45, R 46, R 49, R 60 eller R 61.

**S 56 Lämna detta material och dess behållare till samlingsställe för farligt avfall**

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för alla farliga ämnen och preparat som kan komma att användas av allmänheten, och som kräver särskilt bortskaffande.

**S 57 Förvaras på lämpligt sätt för att undvika miljöförorening**

- Tillämpning:
  - Ämnen som tilldelats symbolen 'N'.
- Kriterier för användning:
  - Normalt begränsad till ämnen som troligen inte kommer att användas av allmänheten.

**S 59 Rådfråga tillverkare/leverantör om återvinning/återanvändning**

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för ämnen som är farliga för ozonskiktet.
  - Rekommenderas för andra ämnen och preparat för vilka återvinning/återanvändning rekommenderas.

**S 60 Detta material och dess behållare skall tas om hand som farligt avfall**

- Tillämpning:
  - Alla farliga ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för ämnen och preparat som troligen inte kommer att användas av allmänheten och som inte tilldelats S 35.

**S 61 Undvik utsläpp till miljön. Läs särskilda instruktioner/varuinformationsblad**

- Tillämpning:
  - Miljöfarliga ämnen.
- Kriterier för användning:
  - Normalt använd för ämnen som tilldelats symbolen 'N'.
  - Rekommenderas för alla ämnen som klassificeras som miljöfarliga och som inte avses ovan.

**S 62 Vid förtäring, framkalla ej kräkning. Kontakta genast läkare och visa denna förpackning eller etiketten**

- Tillämpning:
  - Ämnen och preparat som är klassificerade som hälsoskadliga med R 65 i enlighet med kriterierna i punkt 3.2.3.
  - Gäller inte ämnen och preparat som släpps ut på marknaden i aerosolbehållare (eller i behållare försedda med försluten sprayanordning), se punkterna 8 och 9.
- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för ovannämnda ämnen och preparat om de säljs till eller kan komma att användas av allmänheten, utom i de fall där S 45 eller S 46 är obligatorisk.
  - Rekommenderas för ovannämnda ämnen och preparat vid industriellt bruk, utom i de fall där S 45 eller S 46 är obligatorisk.

**S 63 Vid olycksfall via inandning, flytta den drabbade till frisk luft och låt vila**

- Tillämpning:
  - Mycket giftiga och giftiga ämnen och preparat (gaser, ångor, partiklar, flyktiga vätskor).
  - Ämnen och preparat som ger upphov till sensibilisering vid inandning.

- Kriterier för användning:
  - Obligatorisk för ämnen och preparat som tilldelats R 26, R 23 eller R 42 och som kan komma att användas av allmänheten på ett sådant sätt att det finns risk för inandning.

#### **S 64 Vid förtäring, skölj munnen med vatten (endast om personen är vid medvetande)**

- Tillämpning:
  - Frätande eller irriterande ämnen och preparat.
- Kriterier för användning:
  - Rekommenderas för de ämnen och preparat som nämns ovan och som kan komma att användas av allmänheten och där den ovan nämnda behandlingen är lämplig.

#### 7.5.2 Val av skyddsfraser

Vid det slutliga valet av skyddsfraser skall hänsyn tas till de riskfraser som anges på etiketten och till hur ämnet eller preparatet är avsett att användas:

- Det räcker i allmänhet med högst fyra S-fraser för att ange den viktigaste skyddsinformationen. De sammansatta skyddsfraser som anges i bilaga IV skall betraktas som en fras.
- När det gäller S-fraser som rör bortskaffande, skall en S-fras användas, om det inte är uppenbart att bortskaffande av materialet och dess behållare inte medför någon fara för människors hälsa eller för miljön. Information om hur ämnen och preparat bortskaffas på ett säkert sätt är särskilt viktigt när de säljs till allmänheten.
- Vissa R-fraser blir överflödiga om S-fraserna väljs på rätt sätt och vice versa. S-fraser som uppenbart motsvarar R-fraser behöver endast anges på etiketten i avsikt att betona en viss varning.
- Vid val av skyddsfraser skall särskild vikt fästas vid hur och under vilka förhållanden ämnet eller preparatet är avsett att användas, t.ex. sprayning eller andra aerosoleffekter. Fraser skall väljas med tanke på den avsedda användningen.
- Skyddsfraserna S 1, S 2 och S 45 är obligatoriska för alla mycket giftiga, giftiga och frätande ämnen och preparat som säljs till allmänheten.
- Skyddsfraserna S 2 och S 46 är obligatoriska för alla andra farliga ämnen och preparat (utom sådana som endast är klassificerade som miljöfarliga) som säljs till allmänheten.

När de fraser som valts i enlighet med kriterierna i punkt 6.2 leder till tvetydighet eller till att vissa fraser blir överflödiga, eller när det är uppenbart att vissa inte är nödvändiga för en viss produkt eller förpackning, kan dessa fraser utgå.

#### 8. SPECIALFALL: ÄMNEN

##### 8.1 Transportabla gasbehållare

När det gäller transportabla gasbehållare anses märkningskraven vara uppfyllda när de överensstämmer med bestämmelserna i artikel 23 eller 24.6 b.

Som undantag från artikel 24.1 och 24.2 kan något av följande alternativ användas för gasbehållare som rymmer högst 150 liter:

- Etikettens utformning och storlek kan följa kraven i ISO-standard ISO/DP 7225.
- Den information som anges i artikel 23.2 kan lämnas på en beständig platta eller etikett fäst på behållaren.

## 8.2 Gasbehållare avsedda för propan, butan eller gasol

Dessa ämnen klassificeras i bilaga I. Även om de klassificeras i enlighet med artikel 2, utgörs de ingen fara för människors hälsa när de släpps ut på marknaden som gaser vilka endast är avsedda för förbränning, i slutna påfyllningsbara behållare eller engångsbehållare inom ramen för EN 417.

Dessa behållare måste märkas med lämplig symbol samt R- och S-fraser angående brandfarlighet. Det krävs inte någon information på etiketten om effekterna på människors hälsa. Den information om effekterna på människors hälsa som skulle ha lämnats på etiketten skall dock, i den form som föreskrivs i artikel 27 i direktivet överlämnas till yrkesanvändaren av den person som ansvarar för att släppa ut ämnet på marknaden. Konsumenten skall få tillräcklig information för att denne skal kunna vidta alla nödvändiga hälso- och säkerhetsåtgärder, enligt artikel 1.3 i direktiv 91/155/EEG, ändrat genom direktiv 93/112/EEG.

## 8.3 Metaller i massiv form

Dessa ämnen är klassificerade i bilaga I eller skall klassificeras i enlighet med artikel 6. Vissa av dessa ämnen utgör emellertid, trots att de är klassificerade i enlighet med artikel 2, ingen fara för människors hälsa vid inandning, förtäring eller hudkontakt eller för vattenmiljön i den form de släpps ut på marknaden. Sådana ämnen behöver inte märkas i enlighet med artikel 23. Den som ansvarar för att släppa ut metallen på marknaden skall emellertid förse användaren med all information som annars skulle ha angivits på etiketten, i den form som anges i artikel 27.

## 8.4 Ämnen som tilldelats R 65

Ämnen som klassificeras som hälsoskadliga på grundval av aspirationsrisk behöver inte märkas som hälsoskadliga med R 65 då de släpps ut på marknaden i aerosolbehållare eller i behållare försedda med en försluten sprayanordning.”

---