

## KOMMISJONSDIREKTIV 96/54/EF

2001/EØS/51/33

av 30. juli 1996

**om 22. tilpasning til den tekniske utvikling av rådsdirektiv 67/548/EØF om tilnærming av lover og forskrifter om klassifisering, emballering og merking av farlige stoffer(\*)**

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 67/548/EØF av 27. juni 1967 om tilnærming av lover og forskrifter om klassifisering, emballering og merking av farlige stoffer<sup>(1)</sup>, sist endret ved kommisjonsdirektiv 94/69/EF<sup>(2)</sup>, særlig artikkel 28, og

ut fra følgende betraktninger:

Vedlegg I til direktiv 67/548/EØF inneholder en liste over farlige stoffer og opplysninger om klassifisering, merking og eventuelt karakterisering av hvert stoff ved hjelp av konsentrasjonsgrenser og andre parametere, slik at det er mulig å vurdere hvor farlige de er for menneskers helse og for miljøet. Listen over farlige stoffer i vedlegg I bør tilpasses på bakgrunn av nåværende vitenskapelig og teknisk kunnskap. Det er derfor nødvendig å endre forordet til vedlegg I slik at det omfatter merknader om merking av preparater og en ny gruppe organiske stoffer i tabell B. Listen over farlige stoffer i vedlegg I inneholder stoffer som det for Østerrike og Sverige, ved tiltredelsesakten for Østerrike, Finland og Sverige, ble innvilget særskilte, midlertidige unntak med hensyn til klassifisering og merking. I henhold til tiltredelsesakten skal klassifiserings- og merkingskravene for disse stoffene vurderes på ny. Klassifiseringen for visse av disse stoffene er derfor vurdert på ny.

Vedlegg III til direktiv 67/548/EØF inneholder en liste med setninger som angir arten av de spesielle risikoene som er forbundet med farlige stoffer og preparater. Det må innføres en setning som angir den helsefare som visse stoffer og preparater utgjør i tilfelle innånding.

Vedlegg V til direktiv 67/548/EØF fastsetter metoder for bestemmelse av stoffers og preparaters fysisk-kjemiske egenskaper, toksisitet og økotoksitet. Det er nødvendig med en tilpasning av nevnte vedlegg til den tekniske utvikling.

Vedlegg VI til direktiv 67/548/EØF inneholder allmenne kriterier for klassifisering og merking av farlige stoffer og preparater. Det må innføres kriterier for stoffer og preparater som er helsefarlige ved innånding. Kriteriene for sensibiliserende stoffer og preparater må endres. Det må innføres kriterier for merking av gassbeholdere for propan, butan og flytende petroleumsgass (LPG).

Bestemmelsene i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Komiteen for tilpasning til den tekniske utvikling av direktiver om fjerning av tekniske handelshindringer på området farlige stoffer og preparater —

VEDTATT DETTE DIREKTIV:

*Artikkel 1*

I direktiv 67/548/EØF gjøres følgende endringer:

1. I vedlegg I gjøres følgende endringer:

a) Merknad 4 i forordet skal lyde:

«*Merknad 4*

Preparater som inneholder disse stoffene, skal klassifiseres som helseskadelige med R 65 dersom de oppfyller kriteriene i nr. 3.2.3 i vedlegg VI.»

b) Ny merknad 5 skal lyde:

«*Merknad 5*

(\*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 248 av 30.9.1996, s. 1, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 106/2000 av 30. november 2000 om endring av EØS-avtalens vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se EØS-tillegget til De Europeiske Fællesskaps Tidende nr. 8 av 15.2.2001, s. 7.

<sup>(1)</sup> EFT nr. L 196 av 16.8.1967, s. 1.

<sup>(2)</sup> EFT nr. L 381 av 31.12.1994, s. 1.

Konsentrasjonsgrensene for preparater i gassform uttrykkes i volumprosent.»

- c) Følgende spesialklassifisering for organiske stoffer tilføyes i tabell B i forordet til vedlegg I til direktiv 67/548/EØF:

«647 Enzimas  
Enzymer  
Enzyme  
Ενζυμα  
Enzymes  
Enzymes  
Enzimi  
Enzymen  
Enzimas  
Entsyymit  
Enzymer»

- d) Postene i vedlegg I til dette direktiv erstatter tilsvarende poster.  
e) Postene i vedlegg II til dette direktiv tilføyes for første gang.  
f) Postene med følgende numre utgår:

008-002-00-3,  
612-045-00-9,  
648-011-00-5,  
648-025-00-1,  
648-157-00-X,  
648-158-00-5,  
648-159-00-0,  
649-192-00-3.

- g) Postene gjengitt i vedlegg III til dette direktiv endres ved at alle henvisninger til «R 22» erstattes med en henvisning til «R 65».

2. Følgende setning tilføyes i vedlegg III:

**«R 65**

ES: Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar.

DA: Farlig: kan give lungeskade ved indtagelse.

DE: Gesundheitsschädlich: kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.

EL: Επιδραδες: μπορεί να προκαλέσει δλαδη στους πνευμονες σε περιπτωση καταποσης

EN: Harmful: may cause lung damage if swallowed.

FR: Nocif: peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion.

IT: Nocivo: può causare danni ai polmoni in caso di ingestione.

NL: Schadelijk: kan longschade veroorzaken na verslikken.

PT: Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido.

FI: Haitallista: voi aiheuttaa keuhkovaurion nieltäessä.

SV: Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.»

3. I del B i vedlegg V gjøres følgende endringer:

a) Vedlegg IV A til dette direktiv erstatter overskriften og den generelle innledningen til del B: Metoder for bestemmelse av toksisitet.

b) Vedlegg IV B til dette direktiv innsettes etter kapittel B.1 a).

c) Vedlegg IV C til dette direktiv erstatter kapittel B.6.

d) Vedlegg IV D til dette direktiv erstatter kapittel B.7.

e) Vedlegg IV E til dette direktiv tilføyes til slutt.

4. Vedlegg VI endres som angitt i vedlegg V til dette direktiv.

*Artikkel 2*

1. Med forbehold for nr. 2 skal medlemsstatene senest 31. mai 1998 sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

2. Medlemsstatene skal senest 31. oktober 1997 sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme bestemmelsene i vedlegg V, punkt F, I og J til dette direktiv. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

3. Bestemmelsene nevnt i nr. 1 og 2 skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal vises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

*Artikkel 3*

Dette direktiv trer i kraft den 20. dag etter at det er kunngjort i *De Europeske Fellesskaps Tidende*.

*Artikkel 4*

Dette direktiv er rettet til medlemsstatene.

Utfærdiget i Brussel, 30. juli 1996.

*For Kommisjonen*

Ritt BJERREGAARD

*Medlem av Kommisjonen*

Vedlegg I, II og III til dette direktiv er trykt i sin helhet i *De Europeiske Fellesskaps Tidende* nr. L 248 av 30.9.1996, s. 5-188.

## VEDLEGG IV A

«DEL B: METODER FOR BESTEMMELSE AV TOKSISITET OG ANDRE  
HELSEVIRKNINGER

## GENERELL INNLEDNING: DEL B

## A. FORKLARENDE MERKNAD

I denne innledning gjelder følgende nummerering:

- B.15. Genmutasjon — *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16. Mitotisk rekombinasjon — *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17. Genmutasjonsforsøk in vitro i pattedyrceller
- B.18. DNA-skade og -reparasjon — uregelmessig DNA-syntese in vitro i pattedyrceller
- B.19. Søsterkromatidutvekslingsforsøk in vitro
- B.20. Forsøk med kjønnsbundne recessive dødelige mutasjoner — *Drosophila melanogaster*
- B.21. In vitro-forsøk med celletransformasjoner hos pattedyr
- B.22. Forsøk med dominante dødelige virkninger hos gnagere
- B.23. Cytogenisk forsøk med kjønnsceller fra pattedyr in vitro
- B.24. Flekkforsøk — mus
- B.25. Arvelig translokasjon hos mus
- B.26. Subkronisk toksisitet, oralt inntak: forsøk med 90 dagers gjentatt oral dose med gnagere
- B.27. Subkronisk toksisitet, oralt inntak: forsøk med 90 dagers gjentatt oral dose med andre arter enn gnagere
- B.28. Subkronisk toksisitet, dermalt opptak: forsøk med 90 dagers gjentatt dermal dose med gnagere
- B.29. Subkronisk toksisitet, innånding: forsøk med 90 dagers gjentatt innånding med gnagere
- B.30. Undersøkelse av kronisk toksisitet
- B.31. Undersøkelse av teratogenitet med gnagere og ikke-gnagere
- B.32. Undersøkelse av kreftframkallende egenskaper
- B.33. Kombinert undersøkelse av kronisk toksisitet og kreftframkallende egenskaper
- B.34. Forsøk med toksisitet ved reproduksjon i én generasjon
- B.35. Forsøk med toksisitet ved reproduksjon over to generasjoner
- B.36. Toksikokinetikk

B. GENERELLE DEFINISJONER FOR TERMER BENYTTET VED FORSØKSMETODENE I DETTE  
VEDLEGG

- i) **Akutt toksisitet** omfatter skadelige virkninger som oppstår innen et gitt tidsrom (vanligvis 14 dager) etter tilførsel av én enkelt dose av et stoff.
- ii) **Observerbar toksisitet** er en generell term som beskriver klare tegn på toksisitet etter tilførsel av et forsøksstoff. Disse bør være tilstrekkelige som grunnlag for en risikovurdering og slik at en økning av dosen kan forventes å medføre utvikling av alvorlige tegn på toksisitet og sannsynlig dødelighet.
- iii) **Dose** er den mengde av forsøksstoffet som gis. Dosen uttrykkes som vekt (gram eller milligram) eller som vekten av forsøksstoff per vektenhet forsøksdyr (f.eks. milligram per kilo kroppsvekt) eller som konstante konsentrasjoner i føret (milliondeler eller milligram per kilo fôr).
- iv) **Kritisk dose** er den høyeste av de fire fastsatte dosenivåene som kan gis uten å medføre stoffrelatert dødelighet (herunder avlivning av humane årsaker).

- v) **Dosering** er en generell term som omfatter tilført dose, hyppighet og varighet av tilførsel.
- vi) **LD<sub>50</sub>** (den dose som fører til at halvparten av dyrene i en forsøksgruppe dør) er en statistisk beregnet enkeltdose av et stoff som kan forventes å forårsake død hos 50 % av de dyr som tilføres stoffet. LD<sub>50</sub>-verdien uttrykkes som vekt av forsøksstoffet per vektenhet forsøksdyr (milligram/kilo).
- vii) **LC<sub>50</sub>** (den konsentrasjon som fører til at halvparten av dyrene i en forsøksgruppe dør) er en statistisk beregnet konsentrasjon av et stoff som kan forventes å forårsake død under eksponering eller innenfor et fastsatt tidsrom etter eksponering, hos 50 % av de dyr som eksponeres i et angitt tidsrom. LC<sub>50</sub>-verdien uttrykkes som vekt av forsøksstoffet per standard luftvolum (milligram/liter).
- viii) **NOAEL** er en forkortelse på engelsk for «no observed adverse effect level» (dose uten observert skadevirkning), og er høyeste dose eller eksponeringsnivå der det ikke observeres skadelige virkninger av behandlingen.
- ix) **Toksisitet ved gjentatt tilførsel/subkronisk toksisitet** omfatter de skadelige virkninger som oppstår hos forsøksdyr som følge av gjentatt daglig tilførsel av eller eksponering for et kjemisk stoff i løpet av en liten del av deres forventede levetid.
- x) **Maksimal tolererbar dose (MTD)** er den høyeste dose som framkaller tegn på toksisitet hos dyr uten å ha vesentlig innvirkning på dyrenes overlevingsgrad i det forsøk der den anvendes.
- xi) **Hudirritasjon** er endringer av inflammatorisk art som viser seg etter påføring av et stoff på huden.
- xii) **Øyeirritasjon** er endringer i øyet som viser seg etter påføring av et stoff på øyets framre overflate.
- xiii) **Hudsensibilisering** (kontaktdermatitt) er en immunologisk utløst hudreaksjon på et stoff.
- xiv) **Etsende** virkning på huden er danning av irreversibel vevsskade i huden etter påføring av et forsøksstoff over et tidsrom på mellom tre minutter og fire timer.
- xv) **Toksikokinetikk** er undersøkelsen av forsøksstoffers absorpsjon, distribusjon, stoffskifte og ekskresjon.
- xvi) **Opptak** er prosessen(e) der et tilført stoff trenger inn i kroppen.
- xvii) **Ekskresjon** er prosessen(e) der det tilførte stoff og/eller dets metabolitter utskilles fra kroppen.
- xviii) **Distribusjon** er prosessen(e) der det opptatte stoff og/eller dets metabolitter sirkulerer i kroppen.
- xix) **Stoffskifte** er prosessen(e) der det skjer strukturelle endringer i de tilførte stoffene i kroppen, ved enzymatiske eller ikke-enzymatiske reaksjoner.

#### B.1 Akutt toksisitet — gjentatt dose / subkronisk og kronisk toksisitet

Et stoffs akutte toksiske virkninger og dets toksiske virkninger på visse organer eller hele organismen kan vurderes ved hjelp av ulike toksisitetstests (metode B.1-B.5), som etter tilføring av én enkelt dose kan gi en første indikasjon på toksisiteten.

Avhengig av stoffets toksisitet kan et grenseforsøk eller et fullstendig LD<sub>50</sub>-forsøk benyttes, selv om intet grenseforsøk er fastsatt for innåndingsundersøkelsene, fordi det ikke har vært mulig å bestemme én enkelt grenseverdi for eksponering ved innånding.

Det bør foretrekkes metoder som benytter så få forsøksdyr som mulig og som reduserer dyrenes lidelse til et minimum, for eksempel «faste dose-metoden» (metode B.1 b) og «akutt toksisitet-metoden» (metode B.1 c)). Ved forsøk på nivå 1 kan en undersøkelse på en annen art supplere konklusjonene fra den første undersøkelsen. I så fall kan en standard forsøksmetode benyttes, eller metoden kan tilpasses et mindre antall dyr.

Toksisitetstestet med gjentatt tilførsel (metode B.7, B.8 og B.9) omfatter vurdering av toksiske virkninger av gjentatt eksponering. Behovet for omhyggelige kliniske observasjoner av dyrene understrekes, for at det kan utledes så mye informasjon som mulig. Disse forsøkene bør bidra til bestemmelse av målorganene for toksisitet og toksiske og ikke-toksiske doser. Det kan være påkrevd med en nærmere analyse av disse aspektene i langsiktige undersøkelser (metode B.26-B.30 og B.33).

## B.II Mutagenitet — genotoksisitet

Med mutagenitet menes induksjon av permanente og overførbare endringer i mengden eller strukturen til det genetiske materialet til celler eller organismer. Disse endringene, «mutasjonene», kan omfatte et enkelt gen eller gensegmenter, en genblokk eller hele kromosomer. Virkningene på hele kromosomer kan være strukturelle og/eller numeriske.

Et stoffs mutagene aktivitet vurderes ved *in vitro*-forsøk for gen(punkt)mutasjoner på bakterier (metode B.13/14) og/eller strukturelle kromosomforstyrrelser i pattedyrceller (metode B.10).

*In vivo*-metoder kan også godtas, f.eks. mikrokjerneforsøk (metode B.12) eller metafaseanalyse av beinmargceller (metode B.11). Dersom det ikke foreligger kontraindikasjoner, er imidlertid *in vitro*-metodene langt å foretrekke.

Tilleggsundersøkelser for å undersøke mutagenitet nærmere eller å foreta foreløpige forsøk for kartlegging av en eventuell kreftframkallende egenskap kan være påkrevd for høyere produksjonsvolumer og/eller for å gjennomføre eller oppfølge en risikovurdering, og disse undersøkelsene kan benyttes til en rekke formål: til å bekrefte resultater oppnådd i basisforsøkene, til å undersøke endepunkter som ikke er undersøkt i basisforsøkene, til å starte eller utvide *in vivo*-undersøkelser.

For dette formål omfatter metode B.15 til B.25 eukaryotiske *in vivo*- og *in vitro*-systemer samt et utvidet antall biologiske endepunkter. Disse forsøkene gir opplysninger om punktmutasjoner og andre endepunkter i organismer som er mer sammensatte enn bakteriene som benyttes i basisforsøkene.

Et generelt prinsipp for et program for videre undersøkelser av mutagenitet bør være at det er slik utformet at det gir relevante tilleggsopplysninger om vedkommende stoffs mutagene og/eller kreftframkallende potensial.

Hvilke faktiske undersøkelser som er hensiktsmessige i et bestemt tilfelle, avhenger av en rekke faktorer, herunder stoffets kjemiske og fysiske kjennetegn, resultatene av de innledende bakteriologiske og cytogenetiske forsøk, stoffets stoffskifteprofil, resultatene av andre toksisitetsundersøkelser og stoffets kjente bruksmåter. Et strengt skjema for utvalg av forsøk synes derfor uhensiktsmessig med tanke på alle de forskjellige faktorer som må tas i betraktning.

Enkelte generelle prinsipper for forsøksstrategi er fastsatt i direktiv 93/67/EF, men et dokument, det tekniske veiledningsdokumentet for risikovurdering, har klare forsøksstrategier som likevel er fleksible og som kan tilpasses ved behov etter omstendighetene.

Metoder for videre undersøkelse er imidlertid gruppert nedenfor, etter deres viktigste genetiske endepunkt:

### *Undersøkelser av gen(punkt)mutasjoner*

- a) Undersøkelser av mutasjoner eller tilbakemutasjoner med eukaryote mikroorganismer (*Saccharomyces cerevisiae*) (metode B.15).
- b) *In vitro*-undersøkelser av mutasjon i pattedyrceller (metode B.17).
- c) Forsøk med kjønnsbestemte dødelige mutasjoner i *Drosophila melanogaster* (metode B.20).
- d) *In vivo*-forsøk med somatisk cellemutasjon, flekkforsøk — mus (metode B.24).

### *Undersøkelser av kromosomforstyrrelser*

- a) Cytogenetiske *in vivo*-undersøkelser hos pattedyr; *in vivo*-metafaseanalyse av beinmargsceller bør vurderes dersom den ikke er tatt med i den innledende vurderingen (metode B.11). I tillegg kan det foretas cytogenetiske *in vivo*-undersøkelser av kjønnseller (metode B.23).
- b) *In vitro* cytogenetiske undersøkelser av pattedyrceller, dersom dette ikke er inkludert i den innledende vurderingen.
- c) Undersøkelser av dominant dødelighet hos gnagere (metode B.22).
- d) Forsøk med arvelig translokasjon hos mus (metode B.25).

### *Genotoksiske virkninger — virkninger på DNA*

Genotoksisitet, som kjennetegnes ved potensielt skadelige virkninger på genetisk materiale uten at det nødvendigvis har sammenheng med mutagenitet, kan vise seg ved skade på DNA uten direkte tegn på mutasjon. Følgende metoder, som benytter eukaryotiske mikroorganismer eller pattedyrceller, kan være egnet til slike undersøkelser:

- a) Mitotisk rekombinasjon i *Saccharomyces cerevisiae* (metode B.16).
- b) DNA-skade og -reparasjon — reparasjonssyntese av DNA — pattedyrceller — *in vitro* (metode B.18).
- c) Søsterkromatidutveksling i pattedyrceller — *in vitro* (metode B.19).

#### *Alternative metoder for undersøkelse av kreftframkallende potensial*

Forsøk med celletransformasjon i pattedyr gjør det mulig å måle et stoffs evne til å frambringe endringer i morfologi og atferd i en cellekultur, endringer som antas å ha sammenheng med ondartede transformasjoner *in vivo* (metode B.21). Det kan benyttes en rekke ulike celletyper og transformasjonskriterier.

#### *Risikovurdering av arvelige virkninger hos pattedyr*

Det finnes flere metoder for å måle arvelige virkninger hos hele pattedyr ved gen(punkt)mutasjoner, f.eks. spesifikt locusforsøk på mus, for å måle kjønnsцелеmutasjon i første generasjon (ikke inkludert i dette vedlegg) eller for å måle kromosomforstyrrelser, f.eks. forsøk med arvelig translokasjon hos mus (metode B.25). Slike metoder kan brukes ved vurderingen den genetiske risiko et stoff kan utgjøre for mennesker. På grunn av forsøkens komplekse karakter og det høye antall dyr som kreves, særlig ved det spesifikke locusforsøk på mus, skal det imidlertid tungtveiende grunner til for å gjennomføre disse forsøkene.

### **B.III Kreftframkallende virkning**

Kjemiske stoffer kan beskrives som genotoksiske eller ikke-genotoksiske kreftframkallende stoffer, avhengig av den antatte virkningsmekanismen.

Forhåndsopplysninger om et stoffs genotoksiske kreftframkallende potensial kan fås ved undersøkelser av mutagenitet/genotoksisitet. Tilleggsopplysninger kan fås fra forsøk med gjentatt dose og forsøk med subkronisk eller kronisk toksisitet. Toksisitetsforsøket med gjentatt dose, metode B.7, og lengre undersøkelser med gjentatt dose omfatter en vurdering av observerte histopatologiske endringer, f.eks. hyperplasi i visse vev som kan være av betydning. Disse undersøkelsene og toksikokinetiske opplysningene kan bidra til å identifisere kjemiske stoffer med kreftframkallende potensial, som kan gjøre det påkrevd med grundigere undersøkelse av dette aspektet, i et forsøk med kreftframkallende egenskaper (metode B.32) eller ofte i en kombinert undersøkelse av kronisk toksisitet og kreftframkallende egenskaper (metode B.33).

### **B.IV Reproduksjonstoksisitet**

Reproduksjonstoksisitet kan vise seg på forskjellige måter, f.eks. svekking av reproduksjonsfunksjonen eller -evnen hos hanner og hunner, identifisert som «virkning på fruktbarheten», eller induksjon av ikke-arvelige, skadelige virkninger på avkommet, bestemt som «utviklingstoksisitet», som også omfatter teratogenitet og virkninger under laktasjon.

For undersøkelser av teratogenitet, som inngår i undersøkelsen av utviklingstoksisitet, er forsøksmetoden (metode B.31) primært beregnet på oral tilførsel. Alternativt kan andre tilførselsmåter benyttes, avhengig av forsøksstoffets fysiske egenskaper eller sannsynlige eksponeringsvei for mennesker. I slike tilfeller bør metoden være tilstrekkelig tilpasset, idet det tas hensyn til relevante elementer i 28-dagers forsøksmetodene.

Når det kreves et tregenerasjoners reproduksjonsforsøk (fruktbarhet), kan den beskrevne metode for to generasjoners reproduksjonsforsøket (metode B.35) benyttes slik at den omfatter en tredje generasjon.

### **B.V Nevrotoksisitet**

Nevrotoksisitet kan vise seg på forskjellige måter, f.eks. ved funksjonelle endringer og/eller strukturelle og biokjemiske endringer i det sentrale eller perifere nervesystem. En foreløpig indikasjon på nevrotoksisitet kan utledes av forsøk med akutt toksisitet. Toksisitetsforsøket med gjentatt dose, metode B.7, omfatter en vurdering av nevrotoksiske virkninger, og behovet for omhyggelige kliniske observasjoner av dyrene understrekes, slik at så mye informasjon som mulig framkommer. Metoden bør bidra til å bestemme kjemiske stoffer med nevrotoksiske potensial, som kan gjøre det påkrevd med ytterligere, grundigere undersøkelser av dette aspektet. Dessuten er det viktig å undersøke stoffers potensial for å forårsake bestemte nevrotoksiske virkninger som muligens ikke vil bli påvist i andre toksisitetsundersøkelser. For eksempel er det observert at visse organiske fosforforbindelser forårsaker forsinket nevrotoksisitet, og de kan vurderes ved metode B.37 og B.38 etter tilførsel med enkelt eller gjentatt dose.



#### B.VI Immuntoksisitet

Immuntoksisitet kan vise seg på forskjellige måter, f.eks. ved en immunsuppresjon og/eller økning av immunsystemets følsomhet, som medfører overfølsomhet eller induisert autoimmunitet. Toksisitetsforsøket med gjentatt tilførsel, (metode B.7, omfatter vurdering av immuntoksiske virkninger. Metoden bør bidra til å bestemme kjemiske stoffer med immuntoksiske potensial, som kan kreve ytterligere, grundigere undersøkelser av dette aspektet.

#### B.VII Toksikokinetikk

Toksikokinetiske undersøkelser letter tolkningen og evalueringen av toksisitetsdata. Disse undersøkelsene er ment å belyse særlige aspekter ved toksisiteten til det undersøkte kjemiske stoffet, og resultatene kan være til hjelp ved utformingen av senere toksikologiske undersøkelser. Det er ikke hensikten at alle parametere skal bestemmes i alle tilfeller. Det er bare i sjeldne tilfeller at hele rekken av toksikokinetiske undersøkelser (absorpsjon, ekskresjon, distribusjon og stoffskifte) er nødvendig. For visse forbindelser kan det være tilrådelig å endre denne rekkefølgen, eller det kan være tilstrekkelig med en undersøkelse med én enkelt dose (metode B.36).

Opplysninger om den kjemiske strukturen og fysisk-kjemiske egenskaper kan også gi en indikasjon på absorpsjonskjennetegnene ved den påtenkte tilførselsvei, og om de mulige stoffet i stoffskifteprosessene og hvordan det blir fordelt i vevet. Tidligere toksisitets- og toksikokinetikkundersøkelser kan også gi opplysninger om toksikokinetikkparametere.

#### C. KARAKTERISERING AV FORSØKSSTOFFET

Sammensetningen av forsøksstoffet, herunder viktige urenheter, og relevante fysisk-kjemiske egenskaper, herunder stabilitet, skal være kjent før en toksisitetsundersøkelse påbegynnes.

Forsøksstoffets fysisk-kjemiske egenskaper gir viktige opplysninger for valg av tilførselsvei, utformingen av de forskjellige undersøkelsene og behandling og lagring av forsøksstoffet.

Utviklingen av en analytisk metode for kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av forsøksstoffet (herunder om mulig viktige urenheter) i tilførselsmediet og det biologiske materialet bør foretas før undersøkelsen påbegynnes.

Alle opplysninger med hensyn til forsøksstoffets identifisering, fysisk-kjemiske egenskaper, renhet og atferd skal tas med i forsøksrapporten.

#### D. STELL AV DYR

Ved toksisitetsforsøk er det avgjørende at det føres streng kontroll med omgivelsene og at det benyttes egnede teknikker for stell av dyr.

##### i) Lokaler

Omgivelsene i de lokaler eller bur der forsøkene utføres, skal være egnet for vedkommende dyreart. For rotter, mus og marsvin er egnet romtemperatur  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  med en relativ fuktighet på 30 til 70 %; for kaniner bør romtemperaturen være  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  med en relativ fuktighet på 30 til 70 %.

Enkelte forsøksteknikker er særlig følsomme for temperatursvingninger, og i slike tilfeller omfatter beskrivelsen av forsøksmetoden nærmere opplysninger om egnede forhold. Ved alle forsøk med toksisitet bør temperaturen og fuktigheten kontrolleres, registreres og inkluderes i den endelige rapporten fra forsøket.

Det bør benyttes kunstig belysning med vekslende mellom tolv timers lys og tolv timers mørke. Nærmere opplysninger om belysningsmønsteret skal registreres og inkluderes i den endelige rapporten fra forsøket.

Med mindre annet er angitt i metoden, kan dyrene bo enkeltvis eller i små grupper av samme kjønn. Dersom grupper av dyr bor i bur, skal det være høyst fem dyr i hvert bur.

I rapporter om dyreforsøk er det viktig å opplyse om hvilken type bur som er brukt, og om antallet dyr i hvert bur både under eksponering for det kjemiske stoffet og i den etterfølgende observasjonsperioden.

##### ii) Fôring

Fôret skal oppfylle alle ernæringsmessige krav som forsøksarten stiller. Dersom forsøksstoffene tilføres dyrene i fôret, kan dets næringsverdi reduseres ved interaksjon mellom stoffet og en bestanddel i fôret. Denne muligheten bør tas i betraktning ved tolkningen av forsøksresultatene. Vanlig laboratoriefôr kan benyttes med ubegrenset tilførsel av drikkevann. Valget av fôr kan påvirkes av behovet for å sikre at en hensiktsmessig mengde av forsøksstoffet blandes i fôret, dersom stoffet tilføres gjennom fôret.

Forurensende stoffer i fôret som er kjent for å ha innvirkning på toksisiteten, bør ikke forekomme i konsentrasjoner som kan påvirke resultatene.

## E. DYRENES VELFERD

Ved utarbeiding av forsøksmetoder er det tatt tilstrekkelig hensyn til dyrenes velferd. Det er gitt noen eksempler nedenfor, men listen er ikke uttømmende. Nøyaktig ordlyd og/eller nøyaktige vilkår framgår av de enkelte metodebeskrivelser:

- Ved bestemmelse av akutt oral toksisitet kan to alternative metoder benyttes, nemlig «metoden med fast dose» og «metoden for klassifisering som akutt toksisk». Metoden med fast dose bruker ikke død som spesifikt kriterium for vurdering av toksisiteten, og bruker færre dyr. Metoden for klassifisering som akutt toksisk bruker i gjennomsnitt 70 % færre dyr enn metode B.1 for akutt oral toksisitet. Begge disse alternative metodene innebærer mindre smerte og lidelse enn den klassiske metoden.
- Antallet forsøksdyr reduseres til det vitenskapelig akseptable minimum, idet bare fem dyr av samme kjønn benyttes for hvert doseringsnivå for metode B.1 og B.3; bare ti dyr (og bare fem til negativ kontrollgruppe) benyttes for bestemmelse av hudsensibilisering ved hjelp av maksimeringsforsøk på marsvin (metode B.6); antallet dyr som er nødvendig for positiv kontroll ved undersøkelse av mutagenitet *in vivo* reduseres også (metode B.11 og B.12).
- Dyrenes smerte og lidelse under forsøkene reduseres til et minimum, idet dyr som viser alvorlige og varige tegn på lidelse og smerte, kan avlives på en human måte; tilførsel av forsøksstoffer på en måte som er kjent for å gi betydelig smerte og lidelse på grunn av etsende eller irriterende egenskaper, behøver ikke foretas (metode B.1, B.2 og B.3).
- Forsøk med irrelevant høye doser unngås ved innføring av grenseforsøk, ikke bare i forsøk med akutt toksisitet (metode B.1, B.2 og B.3), men også i *in vivo*-forsøk for mutagenitet (metode B.11 og B.12).
- En strategi for bestemmelse av irriterende egenskaper gjør det nå mulig å unngå å foreta forsøk, eller forsøkene kan reduseres til undersøkelse av ett enkelt dyr, dersom tilstrekkelig vitenskapelig dokumentasjon kan framlegges.

En slik vitenskapelig dokumentasjon kan baseres på stoffets fysiske-kjemiske egenskaper, resultatene fra andre forsøk som allerede er foretatt, eller resultatene av godt validerte *in vitro*-forsøk. Dersom det for eksempel er foretatt en undersøkelse av akutt dermal toksisitet (metode B.3) for et stoff med grenseforsøksdosen og det ikke er observert hudirritasjon, kan ytterligere forsøk med hudirritasjon (metode B.4) være unødvendig; produkter som har vist klart etsende eller alvorlig hudirriterende virkninger ved en undersøkelse av hudirritasjon (metode B.4), bør ikke undersøkes videre for øyeirritasjon (metode B.5).

## F. ALTERNATIVE METODER

Den europeiske union har som et av sine vitenskapelige mål å utvikle og validere alternative metoder som kan gi samme informasjonsnivå som de eksisterende dyreforsøk, men som bruker færre dyr, forårsaker mindre lidelse eller fullstendig unngår bruk av dyr.

Etter hvert som slike metoder blir tilgjengelige, må de i størst mulig grad tas i betraktning i forbindelse med risikovurdering og etterfølgende klassifisering og merking for de aktuelle stoffenes iboende farer.

## G. VURDERING OG TOLKNING

Ved vurdering og tolkning av forsøkene må det tas hensyn til at det bare i begrenset grad er mulig å ekstrapolere resultater fra dyreforsøk og *in vitro*-forsøk direkte til mennesker; dersom det foreligger dokumentasjon om skadelige virkninger hos mennesker, kan disse derfor brukes til å bekrefte forsøksresultatene.

Disse resultatene kan brukes til klassifisering og merking av nye og eksisterende kjemiske stoffer med hensyn til deres virkning for menneskers helse, basert på deres iboende egenskaper, slik de er bestemt og kvantifisert ved disse metodene. Tilsvarende kriterier for klassifisering og merking i vedlegg VI bygger også på vurderingskriteriene for forsøksprotokollene for disse forsøksmetodene.

Resultatene kan også benyttes til risikovurderingsundersøkelser for nye og eksisterende kjemiske stoffer, og egnede forsøksstrategier er for dette formål angitt i de tilsvarende veiledningene.

## H. LITTERATURHENVISNINGER

De fleste av disse metodene er utviklet innenfor rammen av OECD-programmet for forsøksretningslinjer og skal gjennomføres i samsvar med prinsippene for god laboratoriepraksis, slik at det i størst mulig grad sikres «gjensidig aksept av data».

Ytterligere opplysninger finnes i henvisningene omtalt i OECD-retningslinjene og relevant litteratur offentliggjort andre steder.»

## VEDLEGG IV B

## «B.1 c) AKUTT TOKSISITET (ORAL) — METODE FOR KLASSIFISERING SOM AKUTT TOKSISK

1. **METODE**1.1. **Innledning**

Metoden for klassifisering som akutt toksisk gir opplysninger med sikte på både risikovurdering og klassifisering av stoffer.

Metoden benytter tre faste doser, som har en slik nivåfordeling at det er mulig å klassifisere et stoff etter forsøksresultatene. Dessuten gjør framgangsmåten som er beskrevet i denne metoden det mulig å velge ytterligere tre faste doser, som kan benyttes som alternativ ved gitte beslutningstidspunkter eller til ytterligere forsøk. Bruk av en av tilleggsdosene kan vurderes dersom det er ønskelig eller nødvendig med en mer inngående analyse.

Metoden benytter definerte startdoser og tar ikke sikte på beregning av en nøyaktig LD<sub>50</sub>-verdi, men den gir mulighet for å bestemme et eksponeringsintervall der dødelighet er forventet, siden dødelig utgang for en del av dyrene fortsatt er viktigste vurderingskriterium for dette forsøket. Resultatene av forsøket skulle gjøre det mulig å klassifisere etter kriteriene i vedlegg VI. Siden framgangsmåten er sekvensiell, kan varigheten av forsøket være lengre enn framgangsmåten beskrevet i B.1. Hovedfordelen med denne metoden er at den krever et mindre antall dyr enn både metoden for akutt (oral) toksisitet (B.1) og den alternative fastdosemetoden (B.1 bis).

Se også den generelle innledningen til del B.

1.2. **Definisjoner**

Se den generelle innledningen til del B.

1.3. **Prinsipp for forsøksmetoden**

Stoffet tilføres oralt til en gruppe forsøksdyr på et av de fastsatte dosenivåene. Stoffet undersøkes etter en trinnvis framgangsmåte, der det i hvert trinn benyttes tre dyr av samme kjønn. Det er ikke nødvendig å gjøre en innledende observasjonsundersøkelse. Forekomst av stoffrelatert dødelighet blant de behandlede dyrene eller ikke på et trinn vil bestemme neste trinn:

- ytterligere forsøk er unødvendig,
- neste trinn utføres med samme dose, men med dyr av motsatt kjønn,
- neste trinn utføres på neste høyere eller lavere doseringsnivå.

1.4. **Beskrivelse av forsøksmetoden**1.4.1. *Forberedelser*

Unge, sunne, voksne dyr utvelges vilkårlig, merkes med henblikk på identifisering og holdes i sine bur i minst fem dager før forsøket begynner, slik at de venner seg til laboratorieomgivelsene. Dyrene kan grupperes i bur etter kjønn og dose, men antallet dyr per bur må ikke forhindre mulighetene for å observere tydelig hvert enkelt dyr.

Forsøksstoffet gis dyrene i én enkelt dose ved hjelp av en magesonde eller egnet intubasjonskanyle.

Om nødvendig oppløses eller suspenderes forsøksstoffet i en egnet bærer. Det anbefales at det ved enhver anledning benyttes en vandig løsning/suspensjon, og dersom dette ikke er mulig, en løsning/emulsjon i olje (f.eks. maisolje) og som tredje alternativ oppløsning i andre bærere. For ikke-vandige bærere må bærerens toksikologiske kjennetegn være kjent, og dersom dette ikke er tilfellet, må de bestemmes før forsøket.

Dyrene skal faste før forsøksstoffet tilføres (f.eks. natten over for rotter eller tre til fire timer for mus); det skal imidlertid være fri tilgang til drikkevann.

- 1.4.2. *Forsøksvilkår*
- 1.4.2.1. *Forsøksdyr*
- Med mindre det foreligger kontraindikasjoner, er rotter den foretrukne gnagerart. Hunndyr skal ikke ha født, og skal ikke være drektige.
- Ved begynnelsen av undersøkelsen skal variasjonen i dyrenes vekt være minimal, og ikke overstige  $\pm 20\%$  i forhold til gjennomsnittsvekten for hvert kjønn.
- 1.4.2.2. *Antall og kjønn*
- Tre dyr av samme kjønn benyttes i hvert trinn. Begge kjønn kan brukes i første trinn.
- 1.4.2.3. *Dosenivåer*
- Som startdose velges et av følgende tre faste nivåer: 25, 200 og 2000 mg/kg kroppsvekt. Startdosen bør være det nivået som med størst sannsynlighet kan ventes å medføre døden for i hvert fall enkelte av de behandlede dyrene. Et av diagrammene for framgangsmåtene beskrevet i tillegg 1 kan benyttes, avhengig av startdosen.
- Ved valg av kjønn og startdose skal alle tilgjengelige opplysninger brukes, herunder opplysninger om struktur/aktivitets-forhold. Dersom det av disse opplysningene kan slutes at det dødelighet ikke er sannsynlig ved høyeste dosenivå (2000 mg/kg kroppsvekt), bør det gjennomføres en grenseforsøk. Dersom det ikke foreligger opplysninger om forsøksstoffet, bør det av hensyn til dyrenes velferd benyttes en startdose på 200 mg/kg kroppsvekt.
- Det kan til tider være ønskelig med nøyaktigere opplysninger enn dem som kan utledes av forsøket med tre faste dosenivåer på 25, 200 og 2000 mg/kg kroppsvekt. I så fall kan det vurderes å gjennomføre ytterligere forsøk med supplerende fastdosenivåer på 5, 50 eller 500 mg/kg kroppsvekt.
- Doser som det er kjent medfører betydelig smerte eller lidelse på grunn av stoffets etsende eller sterkt irriterende egenskaper, behøver ikke tilføres.
- Tidsrommet mellom behandlingen av de forskjellige gruppene avhenger av tidspunktet da tegnene på toksisitet viser seg, deres varighet og styrke. Behandling av dyr av motsatt kjønn eller behandling med neste dose bør utsettes til det er sikkerhet for at de tidligere behandlede dyr overlever.
- 1.4.2.4. *Grenseforsøk*
- Det kan foretas et grenseforsøk med et dosenivå på 2000 mg/kg kroppsvekt med tre dyr av hvert kjønn. Dersom stoffrelatert død inntreffer, kan det være nødvendig med ytterligere forsøk med 200 (eller 500) mg/kg kroppsvekt.
- 1.4.2.5. *Observasjonsperiode*
- Dyrene skal normalt observeres i 14 dager, med mindre dyr dør tidligere eller må fjernes fra undersøkelsen og avlives humannt av hensyn til dyrenes velferd. Observasjonsperiodens varighet bør imidlertid ikke fastsettes strengt; den bør bestemmes ut fra de toksiske virkninger, hvor raskt de opptrer og restitusjonsperiodens lengde, og kan således forlenges dersom det anses nødvendig. Tidspunktene da tegn på toksisitet oppstår og forsvinner, er viktige, særlig dersom det er en tendens til at tegnene inntreffer sent. Alle observasjoner skal registreres systematisk for hvert enkelt dyr.
- 1.4.3. *Framgangsmåte*
- Etter fasten veies dyrene før forsøksstoffet tilføres. Når forsøksstoffet er tilført, kan føret holdes tilbake i ytterligere tre til fire timer. Dersom en dose tilføres i flere omganger i en gitt periode, kan det være nødvendig å gi dyrene fôr og vann, avhengig av periodens lengde.
- Det største væskevolum som kan tilføres på én gang, avhenger av forsøksdyrets størrelse. Hos gnagere bør volumet normalt ikke overstige 1 ml/100 g kroppsvekt; for vandige løsninger kan imidlertid 2 ml/100 g kroppsvekt vurderes. Variasjonen i forsøksvolum bør minimaliseres ved å tilpasse konsentrasjonen slik at et konstant volum ved alle doser er sikret. Dersom tilførsel av én enkeltdose ikke er mulig, kan dosen gis i delmengder over et tidsrom på høyst 24 timer.
- Forsøksmetoden er nærmere beskrevet i vedlegg I.

#### 1.4.3.1. Generelle observasjoner

Det skal foretas omhyggelige kliniske observasjoner minst to ganger den dagen dosen tilføres, eller oftere dersom dyrenes reaksjon på behandlingen tilsier det, og minst én gang om dagen etter dette. Døende dyr og dyr som viser tegn på alvorlig og varig smerte og lidelse, avlives humannt. Dyr som avlives av humane årsaker, behandles på samme måte som dyr som dør under forsøket.

Dersom dyr avlives av humane årsaker eller blir funnet døde, registreres død tidspunktet så nøyaktig som mulig. Det kreves ytterligere observasjoner dersom dyrene fortsatt viser tegn på toksisitet. Observasjonene skal omfatte endringer i hud og pels, øyne og slimhinner, luftveier, kretsløp, det autonome nervesystem og sentralnervesystemet, somatomotorisk aktivitet og atferdsmønster. Skjelving, kramper, spyttflod, diaré, sløvhet, søvn og koma skal vies særlig oppmerksomhet.

Alle observasjoner skal registreres systematisk og for hvert enkelt dyr.

#### 1.4.3.2. Kroppsvekt

Alle dyr skal veies kort tid før forsøksstoffet tilføres, og deretter minst ukentlig. Vektendringer skal beregnes og registreres. Ved avslutningen av forsøket veies de overlevende dyrene og avlives deretter humannt.

#### 1.4.3.3. Kontroll post mortem

Alle forsøksdyrene, herunder de som døde under forsøket eller er fjernet fra forsøket, skal kontrolleres post mortem. Alle makropatologiske endringer skal registreres for hvert dyr. Mikroskopiundersøkelser av organer som viser tegn på patologiske endringer ved en makroskopisk undersøkelse av dyr som har overlevd i minst 24 timer, kan også vurderes, da det kan gi nyttige opplysninger.

### 2. DATA

Det skal registreres data for hvert enkelt dyr. Dessuten skal alle data oppsummeres i tabellform som for hver forsøksgruppe viser antall dyr som er benyttet, antall dyr som viser tegn på toksisitet, antall dyr som er funnet døde i løpet av forsøket eller blitt avlivet av humane årsaker, død tidspunkt for hvert enkelt dyr, beskrivelse av toksiske virkninger og deres tidsforløp og reversibilitet samt resultatene fra post mortem-kontrollen.

Vedlegg 2 inneholder generelle retningslinjer for tolkning av resultatene med sikte på klassifisering.

### 3. RAPPORTERING

#### Forsøksrapport

Forsøksrapporten skal om mulig inneholde følgende opplysninger:

*Forsøksdyr:*

- art/stamme,
- dyrenes mikrobiologiske tilstand, dersom den er kjent,
- dyrenes antall, alder og kjønn,
- dyrenes opprinnelse, bovilkår, fôr osv.,
- hvert enkelt dyrs vekt ved forsøkets begynnelse, og deretter med ukentlige mellomrom og ved slutten av forsøket.

*Forsøksvilkår:*

- begrunnelse for valg av bærer, med mindre det er vann,
- nærmere opplysninger om tilførselen av forsøksstoffet, herunder tilført dosevolum og doseringstidspunkt,
- nærmere opplysninger om fôr- og vannkvalitet (herunder type/kilde, vannkilde),
- begrunnelse for valg av startdose.

*Resultater:*

- resultater i tabellform ordnet etter kjønn og dosenivå for hvert dyr (dvs. dyr som viser tegn på toksisitet, herunder dødelighet, virkningenes art, grad og varighet),
- begynnelse og tidsforløp for tegn på toksisitet, og hvorvidt disse var reversible for hvert enkelt dyr,
- resultater fra post mortem-kontrollen og eventuelle histopatologiske funn for hvert enkelt dyr.

*Diskusjon av resultatene**Konklusjoner*4. **HENVISNINGER**

Denne metoden tilsvarer TG 423 fra OECD.

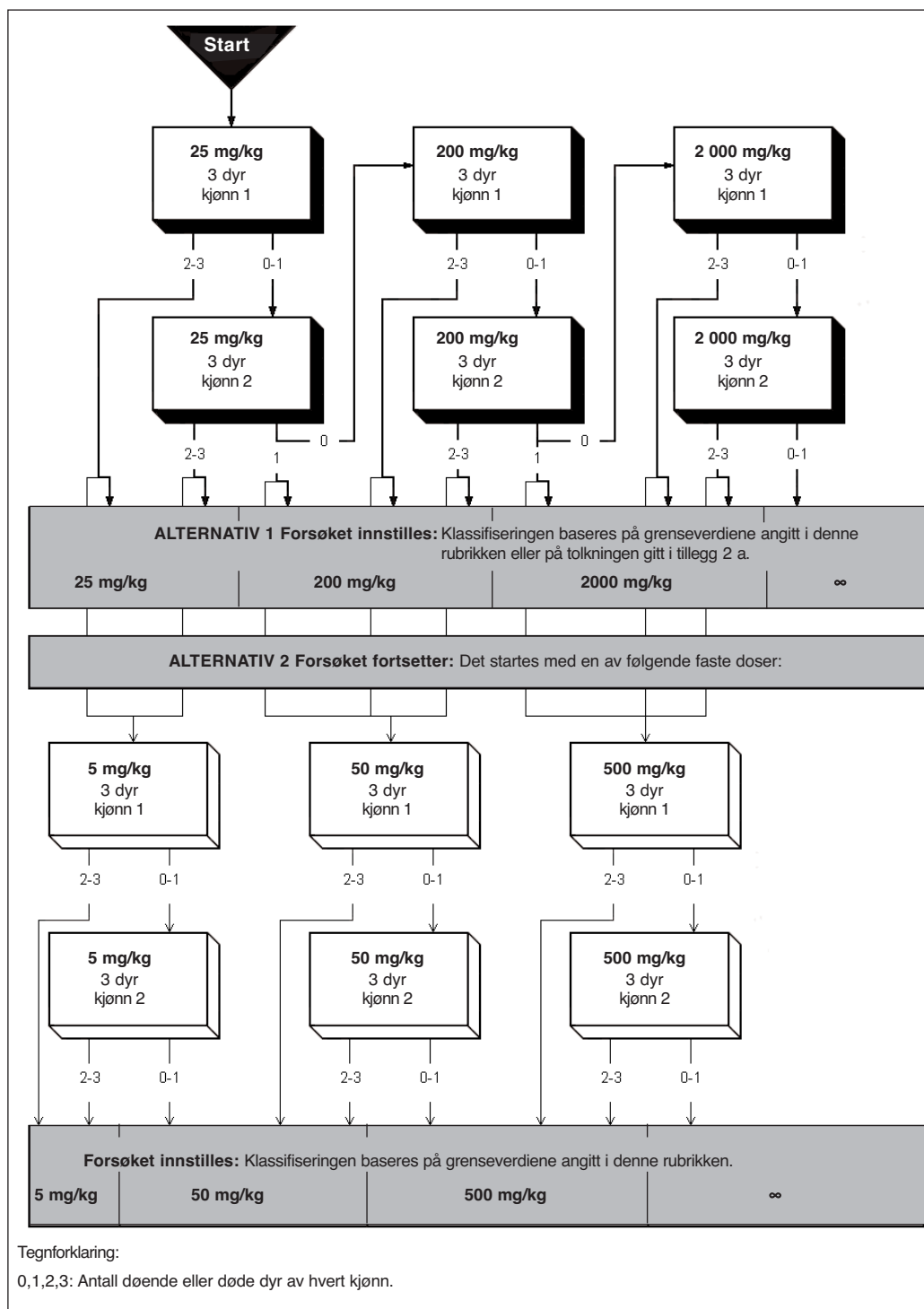
---

## VEDLEGG 1

## FORSØKSMETODE

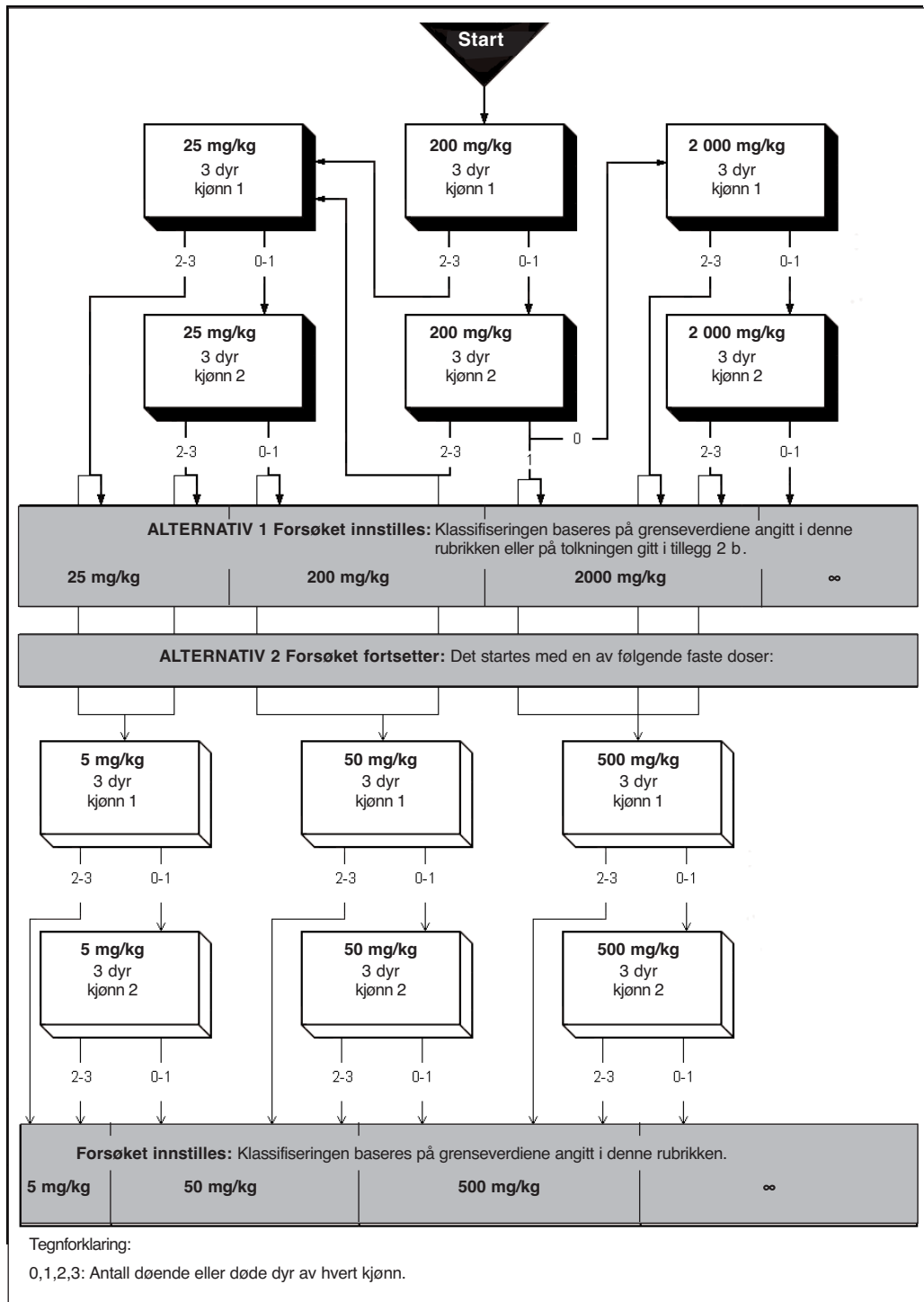
1. Som angitt i nr. 1.4.2.3 bør startdosen være den dosen som kan forventes å medføre døden for i hvert fall enkelte av de behandlede dyrene. Følgende opplysninger kan benyttes ved valg av startdose:
  - data om fysisk-kjemiske egenskaper,
  - struktur/aktivitets-forhold,
  - alle data fra andre toksisitetstests,
  - forventet bruk av forsøksstoffet.
2. For hver startdose er framgangsmåten angitt i det tilsvarende forsøksprogram som er gjengitt i dette vedlegg. Avhengig av antallet døde eller human avlivede dyr, er framgangsmåten som skal følges, angitt med piler.
3. Dersom bare ett dyr av det annet kjønn dør ved en startdose på 25 eller 200 mg/kg kroppsvekt, utføres normalt ingen ytterligere forsøk. Dersom det ikke observeres tegn på toksisitet hos de andre fem dyrene, bør det imidlertid under post mortem-kontrollen tas hensyn til muligheten for at døden ikke er forårsaket av stoffet. I et slikt tilfelle bør forsøket fortsettes med dosering på neste høyere nivå.
4. Dersom ett dyr av hvert kjønn dør ved en dose på 2000 mg/kg kroppsvekt, kan LD<sub>50</sub>-verdien forventes å overstige 2000 mg/kg kroppsvekt. Siden dette er et grenseresultat, bør reaksjonen hos de gjenværende to dyr per kjønn observeres nøye, og forekomst av tydelige og klare tegn på toksisitet hos disse dyrene kan føre til en klassifisering tilsvarende en LD<sub>50</sub>-verdi på 2000 mg/kg kroppsvekt eller mindre, eller begrunne ytterligere forsøk på samme nivå.
5. Framgangsmåten gir mulighet for forsøk med ytterligere tre faste doser (alternativ 2). Denne muligheten kan benyttes til å velge en alternativ dose på et gitt tidspunkt eller til ytterligere forsøk når det pågående forsøk er avsluttet (alternativ 1). Framgangsmåten for alternativ 1 er angitt med fete piler, mens framgangsmåten for alternativ 2 er angitt med tynne piler.

a) Forsøksmetode med en startdose på 25 mg/kg kroppsvekt

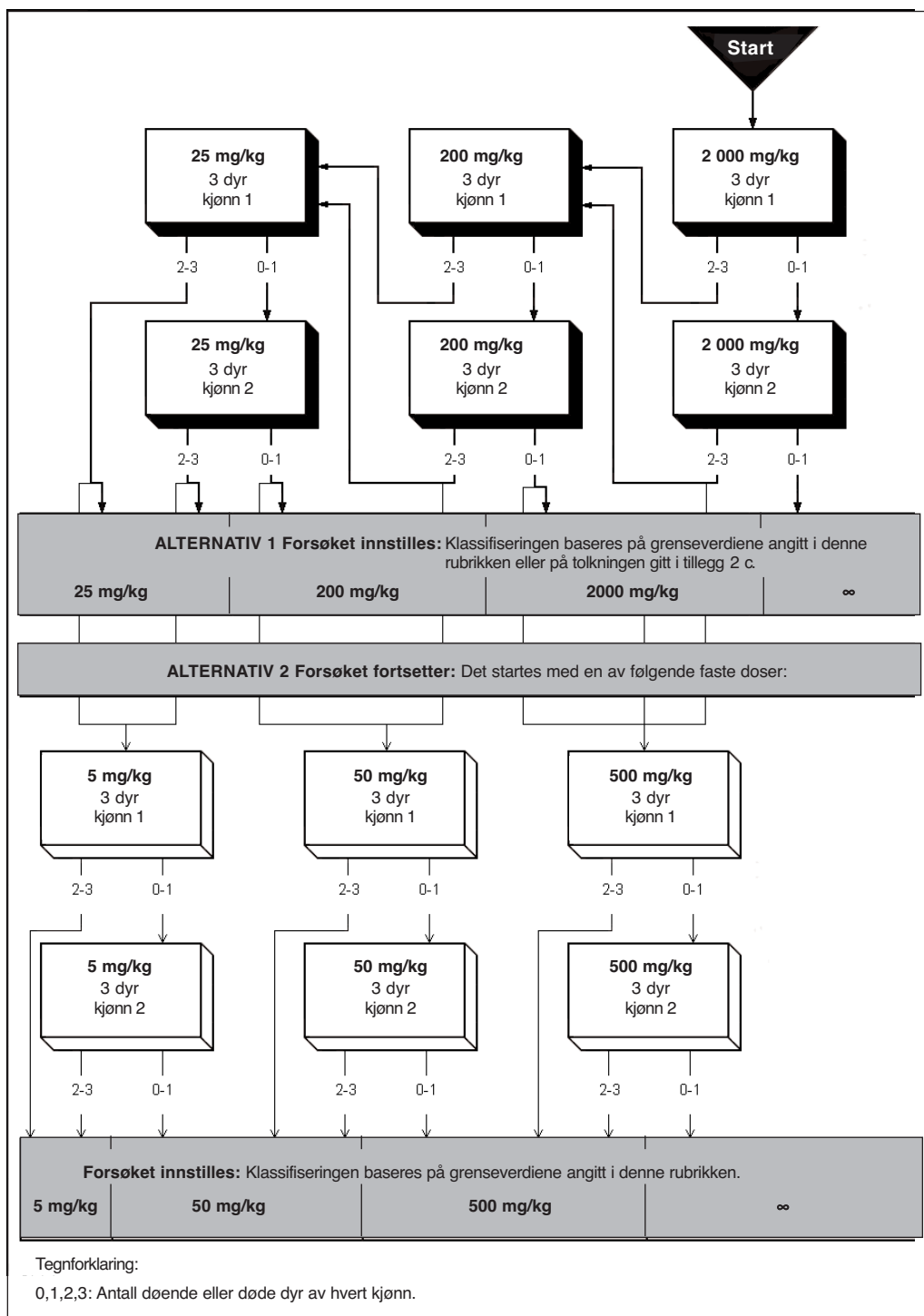




b) Forsøksmetode med en startdose på 200 mg/kg kroppsvekt



c) **Forsøksmetode med en startdosis på 2 000 mg/kg kroppsvekt**



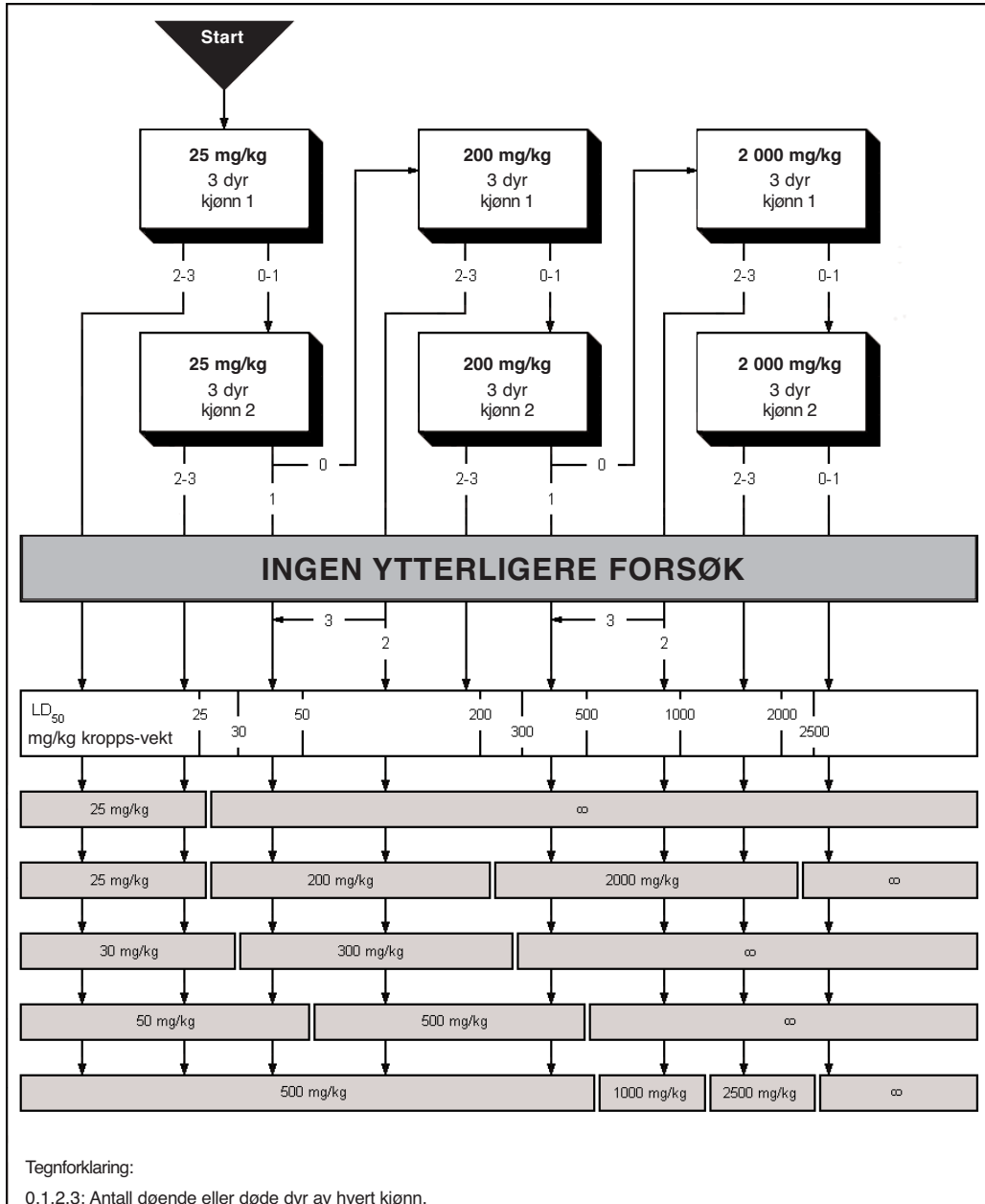
VEDLEGG 2

TOLKNING AV RESULTATENE BASERT PÅ FORSØK ETTER ALTERNATIV 1

De grå rubrikkene under «ingen ytterligere forsøk»-rubrikken i diagrammene i dette tillegg viser grenseverdiene for klassifiseringen. Etter skissen av framgangsmåten etter alternativ 1 følges pilene videre nedover til den relevante grå rubrikk nederst i diagrammet.

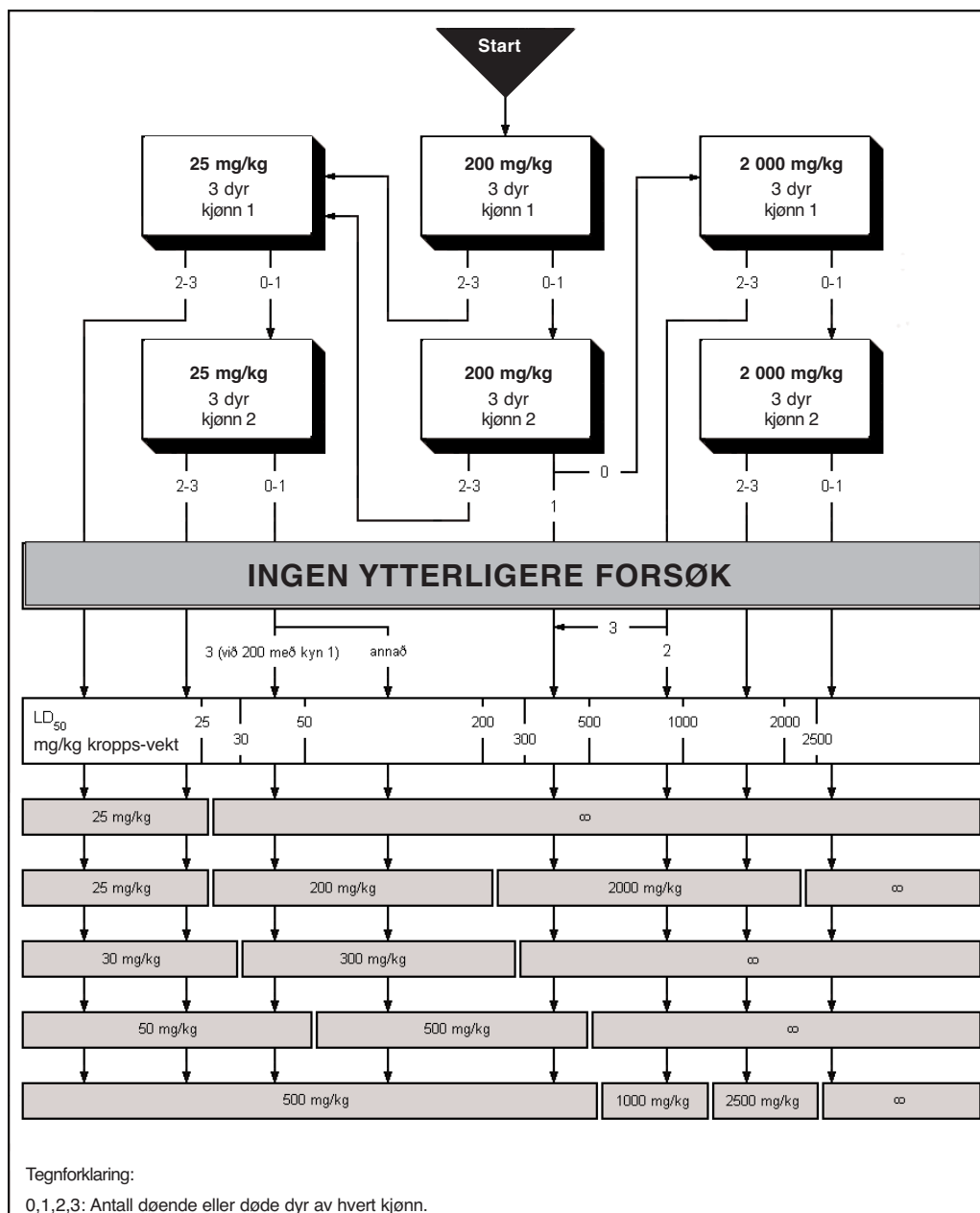
a) Tolkning av resultatene basert på forsøk etter alternativ 1

Startdose: 25 mg/kg kroppsvekt



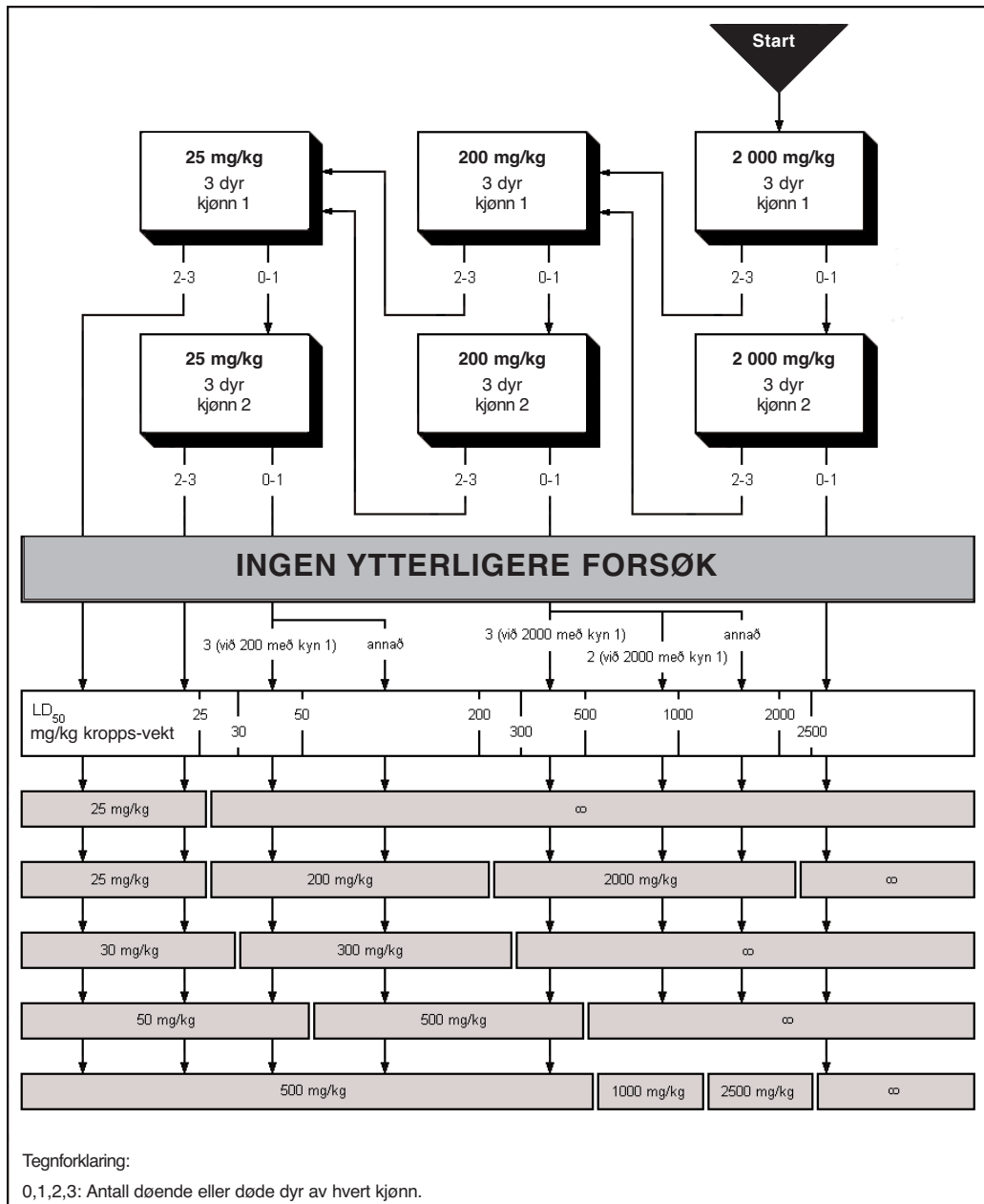
b) Tolkning av resultatene basert på forsøk etter alternativ 1

Startdose: 200 mg/kg kroppsvekt



c) Tolkning av resultatene basert på forsøk etter alternativ 1

Startdose: 2 000 mg/kg kroppsvekt



## VEDLEGG IV C

## «B.6 HUDSENSIBILISERING

## 1. METODE

## 1.1. Innledning

*Merknader:*

I et system for klassifisering av toksisitet etablert med tanke på folkehelsen, er et viktig element forsøk som har følsomhet og evne til å påvise stoffer som kan virke hudsensibiliserende på mennesker.

Det finnes ingen enkelt forsøksmetode som er egnet til å påvise alle stoffer som kan virke hudsensibiliserende på mennesker, og som kan anvendes for alle stoffer.

Ved valg av forsøk må det tas hensyn til faktorer som et stoffs fysiske kjennetegn, herunder dets evne til å trenge igjennom huden.

Det er utviklet to typer forsøk med marsvin: forsøk med hjelpestoff, der en allergisk tilstand forsterkes ved at analysestoffet oppløses eller suspenderes i Freundts komplette hjelpestoff (FCA), og forsøks typer uten hjelpestoff.

Forsøk med hjelpestoff vil normalt kunne forutsi et stoffs sannsynlige hudsensibiliserende virkning hos mennesker med større presisjon enn metoder som ikke benytter Freundts komplette hjelpestoff, og foretrekkes derfor.

Maksimeringsforsøk på marsvin (GPMT) er et mye brukt forsøk med hjelpestoff. Selv om flere andre metoder kan benyttes til å finne et stoffs potensial til å framkalle hudsensibilisering, anses GPMT som den foretrukne forsøksmetoden med hjelpestoff.

For mange grupper av kjemikalier anses forsøk uten hjelpestoff (Buehler-forsøk er det foretrukne blant disse) for å være mindre følsomme.

I noen tilfeller kan det være gode grunner til å velge Buehler-forsøk med lokal påføring i stedet for intradermal injeksjon, som benyttes i maksimeringsforsøk på marsvin. Anvendelse av Buehler-forsøk skal begrunnes vitenskapelig.

Maksimeringsforsøk på marsvin og Buehler-forsøk beskrives i denne metoden. Andre metoder kan benyttes dersom de er korrekt validert og bruken vitenskapelig begrunnet.

Dersom det oppnås et positivt resultat i et anerkjent kartleggingsforsøk, kan forsøksstoffet betegnes som potensielt sensibiliserende, og det vil kanskje ikke være nødvendig å gjennomføre et ytterligere forsøk med marsvin. Dersom det oppnås et negativt resultat, må det imidlertid foretas et forsøk med marsvin etter framgangsmåten beskrevet i denne forsøksmetoden.

Se også den generelle innledningen til del B.

## 1.2. Definisjoner

*Hudsensibilisering* (kontaktdermatitt) er en immunologisk utløst hudreaksjon på et stoff. Hos mennesker kan reaksjonene karakteriseres ved kløe, rødme, ødem, papel, blærer eller en kombinasjon av disse reaksjonene. Andre arter kan få andre reaksjoner, slik at f.eks. bare rødme og ødem kan ses.

*Induksjonseksponering:* Eksperimentell eksponering av et individ for et forsøksstoff med sikte på å framkalle en overfølsomhetstilstand.

*Induksjonsperiode:* Et tidsrom på minst én uke etter en induksjonseksponering da det kan utvikles en overfølsomhetstilstand.

*Provokasjonseksponering:* En eksperimentell eksponering av et tidligere behandlet individ for et forsøksstoff etter en induksjonsperiode, for å bestemme om individet reagerer med overfølsomhet.

### 1.3. Referansestoffer

Den benyttede forsøkssteknikkens følsomhet og pålitelighet skal vurderes hver sjette måned ved hjelp av stoffer som er kjent for å ha milde til moderate hudsensibiliserende egenskaper.

I et korrekt gjennomført forsøk bør det for mildt/moderat sensibiliserende stoffer forventes en reaksjon på minst 30 % i et forsøk med hjelpestoff og minst 15 % i et forsøk uten hjelpestoff.

Følgende stoffer foretrekkes:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-navn	Vanlig navn
101-86-0	202-983-3	$\alpha$ -heksylkanelaldehyd	$\alpha$ -heksylkanelaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (2-merkaptobenzotiazol)	kaptax
94-07-7	202-303-5	benzokain	norkain

Under visse omstendigheter kan andre kontrollstoffer som oppfyller kravene ovenfor benyttes, dersom valget kan begrunnes.

### 1.4. Prinsipp for forsøksmetoden

Forsøksdyrene eksponeres først for forsøksstoffet ved intradermale injeksjoner og/eller en epidermisk påføring (induksjonseksponering). Etter en hvileperiode på 10 til 14 dager (induksjonsperioden), da immunreaksjoner kan utvikles, eksponeres dyrene for en provokasjonsdose. Omfanget og graden av hudreaksjoner på provokasjonseksponeringen hos forsøksdyrene sammenlignes med den som er påvist hos kontrolldyrene som har fått placebo-behandling under induksjonen og deretter utsettes for provokasjonseksponering.

### 1.5. Beskrivelse av forsøksmetodene

Dersom det anses nødvendig å fjerne forsøksstoffet, bør det gjøres ved hjelp av vann eller et egnet løsemiddel uten å endre den eksisterende reaksjonen eller påvirke overhuden.

#### 1.5.1. Maksimeringsforsøk på marsvin (GPMT)

##### 1.5.1.1. Forberedelser

Unge, sunne, voksne albinomarsvin akklimatiseres i laboratorieomgivelsene i minst fem dager før forsøket. Før forsøket fordeles dyrene vilkårlig i behandlingsgrupper og kontrollgrupper. Pels fjernes ved klipping, barbering eller eventuelt ved kjemisk avbusting, avhengig av den benyttede forsøksmetode. Det er viktig at huden ikke skades. Dyrene veies før forsøket begynner, og ved avslutningen.

##### 1.5.1.2. Forsøksvilkår

###### 1.5.1.2.1. Forsøksdyr

Det benyttes albinomarsvin av vanlige laboratoriestammer.

###### 1.5.1.2.2. Antall og kjønn

Det kan benyttes hamndyr og/eller hunndyr. Dersom det benyttes hunndyr, skal de ikke ha født og ikke være drektige.

Behandlingsgruppen skal bestå av minst ti dyr og kontrollgruppen av minst fem dyr. Dersom det har vært benyttet færre enn 20 dyr i behandlingsgruppen og ti i kontrollgruppen, og det ikke er mulig å fastslå at forsøksstoffet virker sensibiliserende, anbefales det sterkt å foreta forsøk på flere dyr, slik at det i alt benyttes minst 20 forsøksdyr og minst ti kontrolldyr.

## 1.5.1.2.3. Dosenivåer

Den konsentrasjon av forsøksstoffet som benyttes ved hver induksjonseksposering, må tolereres godt av dyrenes organisme og bør være den høyeste som framkaller mild til moderat hudirritasjon. Konsentrasjonen som brukes for provokasjonseksposering, bør være den høyeste ikke-irriterende konsentrasjon. Om nødvendig kan aktuelle konsentrasjoner bestemmes ved hjelp av en forundersøkelse med to til tre dyr. Det bør vurderes å benytte FCA-behandlede dyr for dette formål.

## 1.5.1.3. Framgangsmåte

## 1.5.1.3.1. Induksjon

Dag 0 — behandlet gruppe

Det gis tre par intradermale injeksjoner på 0,1 ml i skulderpartiet, der pelsen er fjernet, med én injeksjon fra hvert par på hver side av midtlinjen.

Injeksjon 1: en 1:1-blanding (volum/volum) av FCA/vann eller fysiologisk saltløsning

Injeksjon 2: forsøksstoffet i en egnet bærer ved den valgte konsentrasjon

Injeksjon 3: Forsøksstoffet i den valgte konsentrasjon i en 1:1-blanding (volum/volum) av FCA/vann eller fysiologisk saltløsning

I injeksjon 3 løses vannløselige stoffer i vandig fase før blanding med FCA. Fettløselige eller uløselige stoffer suspenderes i FCA før blanding med vandig fase. Den endelige konsentrasjonen av forsøksstoffet skal være lik den som er benyttet for injeksjon 2.

Injeksjon 1 og 2 gis nær hverandre og nærmest mulig hodet, mens injeksjon 3 plasseres mot den bakre delen av forsøksområdet.

Dag 0 - kontrollgruppe

Det gis tre par intradermale injeksjoner på 0,1 ml på de samme steder som hos forsøksdyrene.

Injeksjon 1: En 1:1-blanding (volum/volum) av FCA/vann eller fysiologisk saltløsning

Injeksjon 2: Ufortynnet bærer

Injeksjon 3: En 50 % løsning (vekt/volum) av bæreren i en 1:1-blanding (volum/volum) av FCA/vann eller fysiologisk saltløsning.

Dag 5 - 7 — behandlet gruppe og kontrollgruppe

Dersom forsøksstoffet ikke virker hudirriterende, behandles forsøksområdet ca. 24 timer før den lokale induksjonspåføringen med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaselin, for å framkalle lokal irritasjon.

Dag 6 - 8 — behandlet gruppe

Pelsen fjernes igjen fra forsøksområdet. Et filterpapir (2 x 4 cm) gjennomvætes med forsøksstoffet i en egnet bærer, påføres forsøksområdet og holdes i kontakt med huden ved hjelp av en tett forbindelse i 48 timer. Valget av bærer skal begrunnes. Faste stoffer pulveriseres fint og inkorporeres i en egnet bærer; væsker kan eventuelt påføres ufortynnet.

Dag 6 - 8 — kontrollgruppe

Pelsen fjernes igjen fra forsøksområdet. Bare bæreren påføres forsøksområdet som tidligere angitt og holdes i kontakt med huden ved hjelp av en tett forbindelse i 48 timer.

## 1.5.1.3.2. Provokasjon

Dag 20 - 22 — behandlet gruppe og kontrollgruppe

Pelsen fjernes fra flankene til de behandlede dyrene og kontrolldyrene. En lapp eller en kapsel som inneholder forsøksstoffet, påføres en av dyrenes flanker, og hvis det er relevant, kan en lapp eller kapsel som bare inneholder bæreren eventuelt påføres den andre av dyrenes flanker. Lappene holdes i kontakt med huden ved hjelp av en tett forbindelse i 24 timer.



#### 1.5.1.3.3. Observasjon og gradering: behandlet gruppe og kontrollgruppe

- Cirka 21 timer etter at lappen er fjernet, renses provokasjonsområdet og kortklippes og/eller barberes om nødvendig
- cirka tre timer senere (cirka 48 timer etter provokasjonspåføringen begynte) observeres og registreres hudreaksjonen etter skalaen som er gjengitt i tillegget
- cirka 24 timer etter denne observasjon gjøres en ny observasjon (72 timer), som også registreres.

Blindlesning av forsøks- og kontrolldyrene anbefales.

Dersom det er nødvendig å klargjøre resultatene fra den første provokasjonseksposeringen, kan en ny provokasjonseksposering vurderes, eventuelt med en ny kontrollgruppe, cirka en uke etter den første. En ny provokasjonseksposering kan også foretas på den opprinnelige kontrollgruppen.

Alle hudreaksjoner og eventuelle uvanlige reaksjoner, herunder systemiske reaksjoner, på induksjons- eller provokasjonseksposeringen skal observeres og registreres etter Magnusson/Kligman-skalaen (se tillegget). Andre framgangsmåter, som histopatologisk undersøkelse eller måling av hudfoldtykkelse, kan benyttes til avklaring av uklare reaksjoner.

#### 1.5.2. *Buehler-forsøk*

##### 1.5.2.1. Forberedelser

Unge, sunne, voksne albinomarsvin akklimatiseres i laboratorieomgivelsene i minst fem dager før forsøket. Før forsøket fordeles dyrene vilkårlig i behandlingsgrupper og forsøksgrupper. Pels fjernes ved klipping, barbering eller eventuelt ved kjemisk avbusting, avhengig av forsøksmetoden. Det er viktig at huden ikke skades. Dyrene veies før forsøket begynner, og ved avslutningen.

##### 1.5.2.2. Forsøksvilkår

###### 1.5.2.2.1. Forsøksdyr

Det benyttes albinomarsvin av vanlige laboratoriestammer.

###### 1.5.2.2.2. Antall og kjønn

Det kan benyttes hanndyr og/eller hunddyr. Dersom det benyttes hunddyr, skal de ikke ha født og ikke være drektige.

Behandlingsgruppen skal bestå av minst 20 dyr og kontrollgruppen av minst ti dyr.

###### 1.5.2.2.3. Dosenivåer

Den konsentrasjon av forsøksstoffet som benyttes ved hver induksjonseksposering, bør være den høyeste som framkaller mild men ikke omfattende irritasjon. Konsentrasjonen som brukes for provokasjonseksposering, bør være den høyeste ikke-irriterende konsentrasjon. Om nødvendig kan riktige konsentrasjoner bestemmes ved hjelp av en forundersøkelse med to til tre dyr.

For vannløselige forsøksmaterialer kan det benyttes vann eller en fortennet ikke-irriterende løsning av et overflateaktivt stoff som bærer. For andre forsøksstoffer foretrekkes en blanding med 80 % etanol/vann for induksjon og aceton for provokasjon.

##### 1.5.2.3. Framgangsmåte

###### 1.5.2.3.1. Induksjon

Dag 0 — behandlet gruppe

Pelsen fjernes (kortklippes) på én av flankene. Kompresen som benyttes til å gjennomføre forsøket skal være gjennomvættet med forsøksstoffet i en egnet bærer (valget av bærer skal begrunnes; forsøksstoffer i væskeform kan eventuelt påføres uforynnnet). Kompresen påføres forsøksområdet og holdes i kontakt med huden ved hjelp av en tett forbindelse eller en kapsel og en egnet forbindelse i seks timer.

Systemet må være tett. Et rundt eller firkantet stykke bomullsvatt er egnet og kan være ca. 4-6 cm<sup>2</sup>. For å sikre okklusjon bør dyrenes bevegelsesfrihet begrenses med egnede midler. Dersom bandasje benyttes, kan ytterligere eksponering være nødvendig.

#### Dag 0 — kontrollgruppe

Pelsen fjernes (kortklippes) på én av flankene. Bare bæreren påføres på samme måte som for de behandlede dyrene. Kompressen som brukes til å gjennomføre forsøket holdes i kontakt med huden ved hjelp av en tett forbindelse eller en kapsel og en egnet forbindelse i seks timer. Dersom det kan påvises at en placebo-behandlet kontrollgruppe ikke er nødvendig, kan en ubehandlet kontrollgruppe benyttes.

#### Dag 6 - 8 og 13 - 15 — behandlet gruppe og kontrollgruppe

Samme påføring som beskrevet for dag 0 foretas på det samme forsøksområdet (om nødvendig med pels fjernet) på samme flanke på dag 6 - 8 og igjen på dag 13 - 15.

#### 1.5.2.3.2. Provokasjon

##### Dag 27 - 29 — behandlet gruppe og kontrollgruppe

Pelsen fjernes (kortklippes) fra den ubehandlede flanken til forsøksdyr og kontrolldyr. En tettsittende klut eller kapsel med en passende mengde forsøksstoff i maksimal ikke-irriterende konsentrasjon festes bakerst på den ubehandlede flanken til forsøksdyrene og kontrolldyrene.

Dersom det er relevant, kan en tettsittende kompress eller kapsel med bare bæreren påføres bakerst på den ubehandlede flanken til forsøksdyr og kontrolldyr. Kompressene eller kapslene holdes i kontakt med huden ved hjelp av en egnet forbindelse i seks timer.

#### 1.5.2.3.3. Observasjon og gradering

- Cirka 21 timer etter at kompressen er fjernet, fjernes pelsen fra forsøksområdet
- cirka tre timer senere (cirka 30 timer etter at provokasjonseksponeringen startet) observeres og registreres hudreaksjonen etter skalaen som er gjengitt i tillegget
- cirka 24 timer etter 30-timersobservasjonen (cirka 54 timer etter provokasjonseksponeringen) observeres og registreres hudreaksjonen på nytt.

Blindlesning av forsøks- og kontrolldyrene anbefales.

Dersom det er nødvendig å klargjøre resultatene fra den første provokasjonseksponeringen, kan en ny provokasjonseksponering vurderes, eventuelt med en ny kontrollgruppe, cirka en uke etter den første eksponeringen. Den nye provokasjonseksponeringen kan også foretas på den opprinnelige kontrollgruppen.

Alle hudreaksjoner og eventuelle uvanlige reaksjoner, herunder systemiske reaksjoner, på induksjons eller provokasjonseksponeringen skal observeres og registreres etter Magnusson/Kligman-skalaen (se tillegget). Andre framgangsmåter, som histopatologisk undersøkelse eller måling av hudfoldtykkelse, kan benyttes til avklaring av uklare reaksjoner.

## 2. DATA (GPMT OG BUEHLER)

Alle resultater skal oppsummeres i tabellform, som for hvert dyr viser hudreaksjonene ved hver observasjon.

## 3. RAPPORTERING (GPMT OG BUEHLER)

Dersom et kartleggingsforsøk foretas før marsvinforsøket, må det sammen med resultatene oppnådd med forsøksstoffet og referankestoffene gis en beskrivelse av eller henvisning til forsøket (f.eks. lokalt lymfeknuteforsøk (LLNA), ørehevelsesforsøk på mus (MEST)), herunder nærmere opplysninger om framgangsmåten.

**Forsøksrapport (GPMT og Buehler-forsøk)**

Forsøksrapporten skal om mulig inneholde følgende opplysninger:

*Forsøksdyr:*

- benyttet marsvinstamme,
- dyrenes antall, alder og kjønn,
- dyrenes opprinnelse, miljø, fôr osv.,
- hvert enkelt dyrs vekt ved forsøkets begynnelse.

*Forsøksvilkår:*

- metode for forberedelse av påføringssted,
- opplysninger om lappematerialer som er benyttet og påføringsmetode,
- resultater av forundersøkelsen med konklusjoner om induksjons- og provokasjonkonsentrasjonene som skal benyttes i forsøket,
- opplysninger om tilberedning, påføring og fjerning av forsøksstoffet,
- begrunnelse for valg av bærer,
- konsentrasjoner av den bærer og det forsøksstoff som er brukt til induksjons- og provokasjonseksposering, og samlet mengde stoff som er anvendt til induksjon og provokasjon.

*Resultater:*

- oppsummering av resultatene av den siste følsomhets- og pålitelighetskontrollen (se nr. 1.3), herunder opplysninger om benyttet stoff, konsentrasjon og bærer,
- alle observasjoner foretatt for hvert enkelt dyr, herunder graderinger,
- beskrivelse av de observerte virkningenes art og styrke,
- eventuelle histopatologiske funn.

*Diskusjon av resultatene**Konklusjoner***4. HENVISNINGER**

Denne metoden tilsvare TG 406 fra OECD.

---

*Tillegg*

## TABELL:

**Magnusson/Kligmans skala for gradering av reaksjonene på provokasjonseksponering**

- 0 = ingen synlig endring,
  - 1 = lett eller flekkvis rødme,
  - 2 = moderat og sammenhengende rødme,
  - 3 = intens rødme og hevelse.»
-

## VEDLEGG IV D

## «B.7 TOKSISITET (ORAL) VED GJENTATT DOSE (28 DAGER)

1. **METODE**1.1. **Innledning**

Se den generelle innledningen til del B.

1.2. **Definisjoner**

Se den generelle innledningen til del B.

1.3. **Prinsipp for forsøksmetoden**

Forsøksstoffet tilføres oralt daglig i graderte doser til flere grupper av forsøksdyr, idet det gis ett dosenivå per gruppe i 28 dager. Under tilføringsperioden observeres dyrene nøye hver dag for tegn på toksisitet. Dyr som dør eller avlives under forsøket, kontrolleres post mortem, og de overlevende dyrene avlives og kontrolleres post mortem ved avslutningen av forsøket.

Denne metoden legger mer vekt på nevrologiske virkninger som et spesifikt endepunkt, og behovet for omhyggelige kliniske observasjoner av dyrene understrekes, slik at det utledes så mye informasjon som mulig. Metoden bør bidra til identifisering av kjemikalier med nevrotoksisk potensial, som kan kreve ytterligere grundige undersøkelser av dette aspektet. Dessuten kan metoden gi en indikasjon på immunologiske virkninger og på stoffets toksisitet for kjønnsorganene.

1.4. **Beskrivelse av forsøksmetoden**1.4.1. *Forberedelser*

Unge, sunne, voksne dyr fordeles dyrene vilkårlig på gruppene for behandlede dyr og kontroll dyr. Burene bør plasseres slik at mulige virkninger som følge av burenes plassering minimeres. Dyrene merkes individuelt og holdes i sine bur i minst fem dager før forsøket begynner, slik at de venner seg til laboratorieomgivelsene.

Forsøksstoffet tilføres med magesonde, i føret eller i drikkevannet. Metoden for oral tilføring avhenger av formålet med forsøket og stoffets fysiske/kjemiske egenskaper.

Om nødvendig oppløses eller suspenderes forsøksstoffet i en egnet bærer. Det anbefales at det om mulig hver gang benyttes vandig løsning/suspensjon først, og dersom dette ikke er mulig, en løsning/emulsjon i olje (f.eks. maisolje) og som tredje alternativ oppløsning i andre bærere. For ikke-vandige bærere må bærerens toksikologiske kjennetegn være kjent. Forsøksstoffets stabilitet i bæreren bør bestemmes.

1.4.2. *Forsøksvilkår*1.4.2.1. **Forsøksdyr**

Rotter er de foretrukne forsøksdyr, men andre gnagerarter også kan benyttes. Det benyttes unge, sunne, voksne individer av alminnelige stammer av laboratoriedyr. Hunndyr skal ikke ha født og skal ikke være drektige. Doseringen bør påbegynnes snarest mulig etter avvenning og i alle tilfeller før dyrene er ni uker gamle.

Ved begynnelsen av undersøkelsen skal variasjonen i dyrenes vekt være minimal og ikke overstige  $\pm 20\%$  i forhold til gjennomsnittsvekten for hvert kjønn.

Dersom en undersøkelse med gjentatt dose foretas som en forundersøkelse til en langtidsundersøkelse, bør det fortrinnsvis benyttes dyr av samme stamme og opprinnelse i begge undersøkelsene.

1.4.2.2. **Antall og kjønn**

Minst ti dyr (fem hunner og fem hanner) benyttes for hvert dosenivå. Dersom det planlegges å avlive dyr underveis i forsøket, bør antallet økes med det antall dyr som planlegges avlivet før undersøkelsen avsluttes.

Dessuten kan en ekstragruppe på ti dyr (fem dyr av hvert kjønn) behandles med høyeste dose i 28 dager og observeres i et tidsrom på 14 dager etter forsøket for reversible, varige eller forsinkede toksiske virkninger. Det benyttes også en ekstragruppe på ti kontrolldyr (fem av hvert kjønn).

#### 1.4.2.3. Dosenivåer

Vanligvis benyttes minst tre forsøksgrupper og én kontrollgruppe. Bortsett fra behandlingen med forsøksstoffet bør dyrene i kontrollgruppen behandles på samme måte som dyrene i forsøksgruppen. Dersom en bærer benyttes ved tilføring av forsøksstoffet, bør kontrollgruppen tilføres samme bærer i høyeste anvendte volum.

Dersom det ut fra vurderingen av andre data ikke forventes virkninger ved en dose på 1 000 mg/kg kroppsvekt per dag, kan det foretas et grenseforsøk. Dersom ingen relevante data er tilgjengelige, kan det foretas en undersøkelse innen doseintervallet som bidrag til å bestemme hvilke doser som skal benyttes.

Ved valg av dose skal alle tilgjengelige data om forsøksstoffets eller beslektede stoffers toksisitet og (toksiko)kinetikk tas i betraktning. Høyeste dosenivå bør velges med sikte på framkalle toksiske virkninger, men ikke dødelighet eller alvorlig lidelse. Deretter velges en fallende rekke av dosenivåer med sikte på å påvise eventuelle doserelaterede reaksjoner og dose uten observert skadevirkning ved laveste dosenivå (NOAEL). Det optimale intervall mellom to doser er ofte en faktor på 2 - 4, og en fjerde forsøksgruppe er ofte å foretrekke framfor bruk av svært store intervaller (f.eks. en faktor på over 10) mellom to doser.

For stoffer som tilføres gjennom føret eller drikkevannet, er det viktig å sikre at mengdene av det tilførte forsøksstoffet ikke påvirker den normale ernærings- eller væskebalansen. Dersom stoffet tilføres gjennom føret, kan det benyttes enten en konstant konsentrasjon i føret (ppm) eller et konstant dosenivå i forhold til dyrets kroppsvekt; alternativet som benyttes, må angis. Dersom stoffet tilføres gjennom magesonde, bør dette skje på samme tidspunkt hver dag, og dosene justeres om nødvendig så dosenivået er konstant i forhold til dyrets kroppsvekt.

Dersom en undersøkelse med gjentatt oralt tilført dose foretas som en forundersøkelse til en langtidsundersøkelse, bør føret være det samme i begge undersøkelsene.

#### 1.4.2.4. Grenseforsøk

Dersom et forsøk gjennomført med et dosenivå på minst 1 000 mg/kg kroppsvekt per dag eller, for tilføring gjennom før eller drikkevann, en tilsvarende konsentrasjon i føret eller drikkevannet (i forhold til kroppsvekten) etter framgangsmåten beskrevet i denne metoden ikke medfører noen observerbare toksiske virkninger, og dersom toksisitet ikke kan forventes ut fra data fra strukturelt beslektede stoffer, kan det anses unødvendig å foreta en full undersøkelse med bruk av tre dosenivåer. I et slikt tilfelle er et begrenset forsøk berettiget, med mindre eksponeringsvirkninger hos mennesker viser at det er behov for å benytte et høyere dosenivå.

1.4.2.5. Observasjonsperioden skal vare i 28 dager. Dyrene i en ekstragruppe bestemt for tilleggsobservasjoner skal observeres uten noen behandling i minst nye 14 dager for å påvise forsinket forekomst av eller vedvarende eller ikke-varige toksiske virkninger.

#### 1.4.3. Framgangsmåte

Dyrene tilføres forsøksstoffet daglig sju dager i uken i 28 dager. Eventuell bruk av fem dagers dosering av stoffet per uke skal begrunnes. Dersom forsøksstoffet tilføres gjennom en sonde, skal dette gis dyret i én enkelt dose gjennom en magesonde eller en egnet intubasjonskanyle. Maksimalt væskevolum som kan tilføres på én gang, avhenger av forsøksdyrets størrelse. Volumet bør ikke overstige 1 ml/100 g kroppsvekt, unntatt for vandige løsninger, der 2 ml/100 g kroppsvekt kan brukes. Unntatt for irriterende eller etsende stoffer, der høyere konsentrasjoner vil medføre sterkere virkninger, bør variasjonen i forsøksvolum minimeres ved en justering av konsentrasjonen slik at det sikres et konstant volum uansett dosenivå.

#### 1.4.3.1. Generelle observasjoner

Det foretas generelle kliniske observasjoner minst én gang om dagen, fortrinnsvis på samme tid(er) hver dag og ut fra hensynet til når de forventede virkningene etter doseringen er sterkest. Dyrenes helsetilstand registreres. Alle dyr observeres minst to ganger daglig for sykdom og dødelighet. Døende dyr og dyr som viser tegn på alvorlig smerte eller lidelse, fjernes umiddelbart når dette observeres, avlives humanitært og kontrolleres post mortem.

En gang før første eksponering (med sikte på sammenligninger for det enkelte individ) og deretter minst én gang i uken foretas detaljerte kliniske observasjoner av samtlige dyr. Disse observasjonene bør foretas utenfor dyrenes egne bur i en standardinnhegning, fortrinnsvis på samme tidspunkt hver gang. De bør registreres omhyggelig, fortrinnsvis ved hjelp av en rangeringsskala som er eksplisitt bestemt av forsøkslaboratoriet. Det bør tilstrebes minimal variasjon i forsøksvilkårene, og observasjonene bør fortrinnsvis foretas av observatører som ikke har kjennskap til behandlingen. Observasjonene bør omfatte, men ikke begrenses til, endringer i hud, pels, øyne, slimhinner, forekomst av sekresjoner og ekskresjoner og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupillstørrelse, uvanlige pustemønstre). Endringer i gange, holdning og reaksjoner på håndtering samt forekomst av kloniske eller toniske bevegelser, stereotyper (f.eks. overdreven pleie, gjentatte sirkelbevegelser) eller merkelig atferd (f.eks. selvlemlesting, baklengs gange) registreres også.

I fjerde eksponeringsuke vurderes reaktiviteten overfor sensoriske stimuli av forskjellig art (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli), gripestyrke og motorisk aktivitet. Litteraturen inneholder ytterligere opplysninger om de metoder som kan benyttes (se den generelle innledningen til del B).

Funksjonelle observasjoner foretatt i fjerde eksponeringsuke kan utelates dersom undersøkelsen foretas som en forundersøkelse til en etterfølgende undersøkelse av subkronisk toksisitet (90 dagers). I så fall inkluderes de funksjonelle observasjonene i den oppfølgende undersøkelsen. På den annen side kan tilgjengeligheten av data fra funksjonelle observasjoner foretatt under undersøkelsen med gjentatt dose lette valget av dosenivåer for en senere subkronisk undersøkelse.

I unntakstilfeller kan funksjonelle observasjoner dessuten utelates for grupper som ellers viser tegn på toksisitet i en grad som i betydelig grad ville innvirke på resultatene av den funksjonelle undersøkelsen.

#### 1.4.3.2. Kroppsvekt og inntak av fôr/vann

Alle dyr skal veies minst én gang i uken. Inntak av fôr og vann måles minst én gang i uken. Dersom forsøksstoffet tilføres gjennom drikkevannet, måles også vanninntaket minst én gang i uken.

#### 1.4.3.3. Hematologi

Følgende hematologiske undersøkelser foretas ved slutten av forsøksperioden: hematokrit, hemoglobinkonsentrasjon, telling av røde blodlegemer, samlet og differensiell telling av hvite blodlegemer, telling av blodplater og måling av blodets koaguleringssevne/-tid.

Det tas blodprøver fra et fastsatt sted umiddelbart før eller i forbindelse med avlivningen av dyrene, og prøvene oppbevares under egnede forhold.

#### 1.4.3.4. Klinisk biokjemi

Klinisk-biokjemiske analyser med sikte på å undersøke viktige toksiske virkninger i vev, spesielt i nyrer og lever, foretas på blodprøver tatt fra alle dyr like før eller i forbindelse med avlivningen av dyrene (unntatt for dyr som er funnet døde eller avlivet under forsøket). Det anbefales at dyrene faster over natten før blodprøvene tas<sup>(1)</sup>. Undersøkelser av plasma eller serum skal omfatte natrium, kalium, glukose, totalt kolesterol, urea, kreatinin, totalt protein og albumin, minst to enzymer hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære virkninger (for eksempel alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk fosfat, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Bestemmelser av andre enzymer (av hepatisk eller annen opprinnelse) og gallesyrer kan under visse omstendigheter gi nyttige opplysninger.

<sup>(1)</sup> For et visst antall analyser i serum og plasma, særlig for glukose, skal dyrene helst ha fastet natten over. Hovedårsaken til dette er at den økte variasjonen i resultatene som fravær av faste uvilkaarlig medfører, vil kunne skjule mindre uttalte virkninger og gjøre tolkningen vanskeligere. På den annen side kan imidlertid fasting natten over innvirke på dyrets normale stoffskifte og kan, særlig i forbindelse med ernæringsundersøkelser, forstyrre den daglige eksponeringen for forsøksstoffet. Dersom fasting natten over benyttes, bør de klinisk-biokjemiske analysene foretas etter de funksjonelle observasjonene i undersøkelsens fjerde uke.

Eventuelt kan følgende urinanalyser foretas i løpet av forsøkets siste uke, idet tidsavhengige urinprøver benyttes: Utseende, volum, osmolalitet eller spesifikk tetthet, pH, protein, glukose eller blod/blodceller.

Dessuten bør det vurderes å gjennomføre undersøkelser av serummarkører for generelle vevsskader. Andre analyser som bør foretas dersom forsøksstoffets kjente egenskaper kan eller forventes å kunne påvirke beslektede stoffskifteprofiler, omfatter kalsium, fosfat, triglycider ved faste, bestemte hormoner, methemoglobin og kolinesterase. Disse undersøkes for stoffer i bestemte stoffgrupper eller fra tilfelle til tilfelle.

Det er i det hele tatt behov for en fleksibel framgangsmåte, avhengig av benyttet art og de observerte og/eller forventede virkninger med et bestemt stoff.

Dersom det ikke foreligger tilstrekkelig med tidligere mottatte historiske basisdata, bør det vurderes å bestemme hematologiske og klinisk-biokjemiske variabler før doseringen begynner.

#### 1.4.3.5. Kontroll post mortem

Alle forsøksdyrene skal gjennomgå en fullstendig kontroll post mortem, som skal omfatte en omhyggelig undersøkelse av den eksterne kroppsoverflaten, alle kroppsåpninger samt kranie-, toraks- og bukhulen og innholdet i disse. Lever, nyrer, binyrer, testikler, bitestikler, brissel, milt, hjerne og hjerte befrires for alt vedhengende vev og veies våte så raskt som mulig etter disseksjonen for å unngå uttørring.

Følgende vev skal oppbevares i det best egnede fikseringsmedium etter vevstype og fastsatte senere histopatologiske undersøkelser: Alle organer og vev med store lesjoner, hjerne (representative regioner: cerebrum, cerebellum og pons), ryggmarg, magesekk, tykktarm og tynntarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, brissel, skjoldbruskkjertel, spiserør og lunger (konservert ved oppumping med fikseringsmedium, deretter nedsenkning), kjønnskjertler, sekundære kjønnsorganer (f.eks. uterus, prostata), urinblære, lymfeknuter (om mulig én lymfeknute som har vært i berøring med inntaksveien, og en annen langt fra inntaksveien, slik at systemiske virkninger kan dekkes), perifere nerver (isjias- eller tibialnerven), fortrinnsvis nær muskelen, og en del av beinmargen (eller eventuelt et nypreparert beinmargspirat). De kliniske og øvrige funn kan avdekke et behov for å undersøke ytterligere vev. Også organer som ut fra forsøksstoffets kjente egenskaper kan antas å være målorganer, bør konserveres.

#### 1.4.3.6. Histopatologisk undersøkelse

Full histopatologisk undersøkelse skal foretas på konserverte organer og vev fra alle dyr i kontrollgruppen og i gruppen behandlet med den høyeste dosen. Disse undersøkelsene utvides til alle andre grupper eksponert for lavere doser dersom endringer knyttet til forsøksstoffet observeres i gruppen behandlet med den høyeste dosen.

Alle store lesjoner skal undersøkes.

Dersom en ekstragruppe benyttes, foretas en histopatologisk undersøkelse av de vev og organer der det observeres virkninger i de behandlede grupper.

## 2. DATA

Data skal dokumenteres for hvert enkelt dyr. Utover dette oppsummeres dataene i tabellform som for hver forsøksgruppe viser antall dyr ved begynnelsen og avslutningen av forsøket, antall dyr funnet døde under forsøket eller avlivet av humane årsaker, tidspunkt for død eller avlivning, antall som viser tegn på toksisitet, beskrivelse av de observerte tegn på toksisitet, herunder tidspunkt da de toksiske virkninger viste seg, deres varighet og grad, antall dyr med lesjoner og hvor prosentdelen av dyr med de ulike lesjonene.

Dersom det er mulig evalueres de numeriske resultater etter en egnet og alminnelig anerkjent statistisk metode. Den statistiske metoden skal velges i forbindelse med utformingen av forsøket.



**3. RAPPORTERING****Forsøksrapport**

Forsøksrapporten skal om mulig inneholde følgende opplysninger:

*Forsøksdyr:*

- benyttet art/stamme,
- dyrenes antall, alder og kjønn,
- dyrenes opprinnelse, bovilkår, fôr osv.,
- hvert enkelt dyrs vekt ved forsøkets begynnelse, og deretter med ukentlige mellomrom og ved slutten av forsøket.

*Forsøksvilkår:*

- begrunnelse for valg av bærer, med mindre det er vann,
- begrunnelse for valg av dosenivå,
- opplysninger om forsøksstoffets sammensetning/tilberedning, oppnådd konsentrasjon og preparatets stabilitet og homogenitet,
- opplysninger om tilførselen av forsøksstoffet,
- omregning av forsøksstoffets konsentrasjon (ppm) i fôr/drikkevann til faktisk dose (mg/kg kroppsvekt per dag), hvis relevant,
- nærmere opplysninger om fôr- og vannkvalitet.

*Resultater:*

- kroppsvekt/endringer i kroppsvekt,
- fôrinntak og eventuelt vanninntak,
- opplysninger om toksiske reaksjoner etter kjønn og dosenivå, herunder tegn på toksisitet,
- de kliniske observasjoners art, grad og varighet (med opplysninger om reversibilitet),
- vurdering av sensorisk aktivitet, gripestyrke og motorisk aktivitet,
- hematologiske forsøk med relevante referanseverdier,
- klinisk-biokjemiske forsøk med relevante referanseverdier,
- kroppsvekt ved avlivning og vekten til organer,
- resultater fra post mortem-kontroll,
- detaljert beskrivelse av alle histopatologiske funn,
- absorpsjonsdata, hvis tilgjengelige,
- statistisk behandling av resultatene, dersom det er relevant.

*Diskusjon av resultatene**Konklusjoner***4. HENVISNINGER**

Denne metoden tilsvarer TG 407 fra OECD.»

---

## VEDLEGG IV E

**«B.37 FORSINKET NEVROTOKSISITET FOR ORGANISKE FOSFORFORBINDELSER ETTER AKUTT EKSPONERING****1. METODE****1.1. Innledning**

Ved vurdering og evaluering av stoffers toksiske virkninger er det viktig å undersøke visse stoffgruppers potensial for å framkalle bestemte typer nevrotoksisitet som muligens ikke kan påvises i andre toksisitetsundersøkelser. Visse organiske fosforforbindelser har vist seg å forårsake forsinket nevrotoksisitet og bør undersøkes etter denne metoden.

Det kan benyttes *in vitro*-kartleggingsforsøk for å identifisere stoffer som kan forårsake forsinket polynevropati; negative resultater av *in vitro*-undersøkelser beviser imidlertid ikke at forsøksstoffet ikke er nevrotoksisk.

Se også den generelle innledningen til del B.

**1.2. Definisjoner**

*Organiske fosforforbindelser* omfatter uladete organofosforestere, tioestere eller anhydrider av organofosforsyrer, organofosfonsyrer og organofosforamidsyrer eller tilsvarende fosfortiosyrer, fosfontiosyrer og fosfortioamidsyrer, eller andre stoffer som kan forårsake den forsinkede nevrotoksisitet som til tider forekommer i denne stoffgruppen.

*Forsinket nevrotoksisitet* er et syndrom forbundet med langvarig, forsinket forekomst av ataksi, distal aksonopati i ryggmargen og perifere nerver og hemming og aldring av NTE (Neuropathy Target Esterase) i nervevev.

**1.3. Referansestoffer**

Et referansestoff kan undersøkes med en positiv kontrollgruppe som middel til å påvise at den undersøkte artens reaksjon ikke har endret seg vesentlig under forsøksvilkårene.

Et eksempel på et mye brukt nevrotoksisk stoff er tri-*o*-tolylfosfat (CAS-nr. 78-30-8, EINECS-nr. 201-103-5, CAS-nomenklatur: fosforsyre, tris(2-metylfenyl)ester), også kjent som tris-*o*-kresylfosfat.

**1.4. Prinsipp for forsøksmetoden**

Forsøksstoffet tilføres oralt i én enkelt dose til tamhøns som om nødvendig har vært beskyttet mot akutt kolinerge virkninger. Dyrene observeres i 21 dager for unormal atferd, ataksi og lammelse. Biokjemiske målinger, særlig NTE-hemming (Neuropathy Target Esterase Inhibition), foretas på tilfeldig utvalgte høns fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer etter doseringen. 21 dager etter eksponeringen avlives resten av hønsene, og histopatologisk undersøkelse av utvalgt nervevev foretas.

**1.5. Beskrivelse av forsøksmetoden****1.5.1. Forberedelser**

Unge, sunne, voksne høns som er frie for forstyrrende virussykdommer og medisiner og avvikende gange, utvelges vilkårlig, fordeles i forsøks- og kontrollgrupper og tilvennes laboratorieforholdene i minst fem dager før forsøket begynner.

Det benyttes bur eller innhegninger som er store nok til at hønsene kan bevege seg fritt og deres gange observeres uhindret.

Forsøksstoffet bør normalt tilføres oralt ved tvangsføring, med gelatinkapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan tilføres uførtynnet eller løst i en egnet bærer, f.eks. maisolje; faste stoffer bør om mulig gis i løst form, siden store doser faste stoffer i gelatinkapsler ikke alltid absorberes effektivt. For ikke-vandige bærere skal bærerens toksiske kjennetegn være kjent; i motsatt tilfelle bestemmes de før forsøket starter.

### 1.5.2. *Forsøksvilkår*

#### 1.5.2.1. Forsøksdyr

Unge, voksne verpehøns (*Gallus gallus domesticus*), 8 til 12 måneder gamle, anbefales. Raser og stammer av standardstørrelse bør benyttes, og hønsene bør normalt være oppdrettet under forhold som tillot fri bevegelse.

#### 1.5.2.2. Antall og kjønn

I tillegg til forsøksgruppen bør det benyttes både en gruppe til kontroll av bærer og en positiv kontrollgruppe. Bærerkontrollgruppen behandles på samme måte som forsøksgruppen, med unntak av tilføring av forsøksstoffet.

Det benyttes tilstrekkelig mange høns i hver gruppe til at minst seks fugler kan avlives for biokjemisk bestemmelse (tre på hvert av to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 21 dager lange observasjonsperioden for patologisk undersøkelse.

Den positive kontrollgruppen kan undersøkes samtidig eller kan være en nylig historisk kontrollgruppe. Gruppen bør inneholde minst seks høns, behandlet med et kjent nevrotoksisk stoff med forsinket virkning, tre høns for biokjemisk undersøkelse og tre for patologisk undersøkelse. Regelmessig ajourføring av tidligere mottatte historiske data anbefales. Det bør utarbeides nye positive kontrolldata når et vesentlig element (f.eks. stamme, fôr, laboratoriemiljø) for gjennomføringen av forsøket er blitt endret av laboratoriet som foretar forsøket.

#### 1.5.2.3. Dosenivåer

Det gjennomføres en forundersøkelse med et passende antall høns og dosenivågrupper med sikte på å fastsette det dosenivå som skal benyttes for hovedundersøkelsen. En viss dødelighet er vanligvis nødvendig i denne forundersøkelsen. For å forhindre død som følge av akutt kolinerge virkninger kan imidlertid atropin eller et annet beskyttende middel som man vet ikke har noen innvirkning på forsinkede nevrotoksiske reaksjoner, benyttes. En rekke forsøksmetoder kan benyttes til å beregne maksimal ikke-dødelig dose av forsøksstoffene (se metode B.1 b). Historiske data fra undersøkelser av høns eller andre toksikologiske opplysninger kan også være nyttige ved bestemmelse av dose.

Dosenivået som benyttes i hovedundersøkelsen bør være så høyt som mulig, idet det tas hensyn til resultatene av forundersøkelsen for valg av dose og den øvre grense på 2 000 mg/kg kroppsvekt. Eventuell dødelighet som måtte forekomme, må ikke forhindre at tilstrekkelig mange dyr overlever for den biokjemiske (seks) og histologiske (seks) undersøkelsen etter 21 dager. Atropin eller et annet beskyttende middel som man vet ikke har noen innvirkning på forsinkede nevrotoksiske reaksjoner, bør benyttes for å forhindre død som følge av akutt kolinerge virkninger.

#### 1.5.2.4. Grenseforsøk

Dersom et forsøk foretas etter framgangsmåten beskrevet her med et dosenivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvekt per dag uten at det framkaller observerbare toksiske virkninger, og dersom toksisitet ikke kan forventes ut fra data om strukturelt beslektede stoffer, kan en undersøkelse med en høyere dose betraktes som unødvendig. Grenseforsøket får anvendelse med mindre eksponering av mennesker viser et behov for å benytte et høyere dosenivå.

#### 1.5.2.5. Observasjonsperiode

Observasjonsperioden varer i 21 dager.

### 1.5.3. *Framgangsmåte*

Etter tilføring av et beskyttende stoff for å forhindre død som følge av akutt kolinerge virkninger tilføres forsøksstoffet i én enkelt dose.

#### 1.5.3.1. Generelle observasjoner

Observasjonen må starte umiddelbart etter eksponeringen. Alle høns observeres omhyggelig flere ganger i løpet av de første to dagene, og deretter minst daglig i 21 dager eller til fastsatt avlivning. Alle tegn på toksisitet registreres, herunder tidspunktet da unormal atferd viste seg og dens type, grad og varighet. Ataksi måles etter en tallskala med minst fire nivåer, og lammelse registreres. Høns som er utvalgt for patologisk undersøkelse, tas ut av burene minst to ganger i uken og tvinges til motorisk aktivitet, for eksempel stigeclatring, for å lette observasjonen av små tegn på toksisitet. Døende dyr og dyr med alvorlig lidelse eller smerte fjernes umiddelbart fra forsøket, avlives human og kontrolleres post mortem.

#### 1.5.3.2. Kroppsvekt

Alle høns veies like før forsøksstoffet tilføres og deretter minst ukentlig.

#### 1.5.3.3. Biokjemisk undersøkelse

Seks vilkårlig valgte høns fra hver av forsøksgruppene og bærerkontrollgruppene og tre høns fra den positive kontrollgruppen (dersom denne gruppen undersøkes på samme tid) avlives få dager etter doseringen, og hjernen og den lumbale ryggmarg prepareres og undersøkes for NTE-hemming. Dessuten kan det være nyttig å preparere og undersøke isjiasnervevevet for NTE-hemming. Normalt avlives tre fugler i kontrollgruppen og hver av forsøksgruppene etter 24 timer og tre etter 48 timer, mens tre høns i den positive kontrollgruppen avlives etter 24 timer. Dersom observasjon av kliniske tegn på forgiftning (dette kan ofte vurderes ved observasjon på tidspunktet da kolinerge symptomer viser seg) indikerer at det toksiske stoffet utskilles svært langsomt, kan det være bedre å ta vev fra tre fugler på hvert av to andre tidspunkter mellom 24 og senest 72 timer etter tilførselen.

Dersom det anses hensiktsmessig, kan det også foretas analyser av acetylkolinesterase (AChE) på prøvene. Imidlertid kan spontan reaktivering av acetylkolinesterase forekomme *in vivo*, som kan føre til at stoffets styrke som en AChE-hemmer undervurderes.

#### 1.5.3.4. Kontroll post mortem

Kontroll post mortem av alle forsøksdyrene (avlivet som fastsatt eller fordi de var døende) skal omfatte observasjon av hjernens og ryggmargens utseende.

#### 1.5.3.5. Histopatologisk undersøkelse

Nervevev fra dyr som overlever observasjonsperioden og som ikke benyttes til biokjemiske undersøkelser, skal gjennomgå en mikroskopundersøkelse. Vevet fikseres *in situ* ved hjelp av perfusjonsteknikker. Snittene bør omfatte cerebellum (lengdesnitt langs midtlinjen), medulla oblongata, ryggmarg og perifere nerver. Ryggmargssnitt tas fra den øvre cervikale delen, midt i brysthulen og i det lumbosakrale området. Det tas snitt fra det distale området av tibialnerven og dens forgreninger til Musculus gastrocnemius og av isjiasnerven. Snittene farges med hensiktsmessige myelin- og aksonspesifikke farger.

## 2. DATA

Dersom resultatene for de valgte endepunktene i denne metoden (biokjemi, histopatologi og observasjon av atferd) er negative, kreves normalt ingen ytterligere undersøkelser for forsinket nevrotoksisitet. Ved tvetydige eller uklare resultater for endepunktene kan ytterligere undersøkelser være nødvendige.

Data skal angis for hvert enkelt dyr. Utover dette oppsummeres dataene i tabellform som for hver forsøksgruppe viser antall dyr ved begynnelsen av forsøket, antall dyr med skader, atferdsmessige eller biokjemiske virkninger, disse skadenes eller virkningenes type og grad og prosentdelen av dyr med hver enkelt type og grad av skade eller virkning.

Resultatene av denne undersøkelsen bør vurderes med hensyn til forekomst, grad og korrelasjon av atferdsmessige, biokjemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerte virkninger i de behandlede gruppene og kontrollgruppene.

Numeriske resultater evalueres etter egnede og anerkjente statistiske metoder. De statistiske metodene skal velges ved utforming av undersøkelsen.

**3. RAPPORTERING****Forsøksrapport**

Forsøksrapporten skal om mulig inneholde følgende opplysninger:

*Forsøksdyr:*

- benyttet stamme,
- dyrenes antall og alder,
- dyrenes opprinnelse, bovilkår osv.,
- hvert enkelt dyrs vekt ved forsøkets begynnelse.

*Forsøksvilkår:*

- nærmere opplysninger om forsøksstoffets tilberedning, stabilitet og eventuelt homogenitet,
- begrunnelse for valg av bærer,
- nærmere opplysninger om tilførselen av forsøksstoffet,
- nærmere opplysninger om fôr- og vannkvalitet,
- begrunnelse for valg av dosenivå,
- angivelse av hvilke doser som er gitt, herunder opplysninger om bærer, volum og fysisk form til det tilførte stoffet,
- opplysninger om identiteten til et eventuelt beskyttende middel, og nærmere opplysninger om tilførselen.

*Resultater:*

- kroppsvekt,
- data om toksiske reaksjoner etter gruppe, herunder dødelighet,
- de observerte kliniske virkningers art, grad og varighet (med opplysninger om reversibilitet),
- detaljert beskrivelse av alle biokjemiske metoder og resultatene,
- funn fra post mortem-kontrollen,
- detaljert beskrivelse av alle histopatologiske funn,
- statistisk behandling av resultatene, hvis relevant.

*Diskusjon av resultatene**Konklusjoner***4. HENVISNINGER**

Denne metoden tilsvare TG 418 fra OECD.»

---

## «B.38 FORSINKET NEVROTOKSISITET VED ORGANISKE FOSFORFORBINDELSER VED GJENTATT TILFØRSEL OVER 28 DAGER

### 1. METODE

#### 1.1. Innledning

Ved vurdering og evaluering av stoffers toksiske virkninger er det viktig å undersøke visse stoffgruppers potensial for å framkalle bestemte typer nevrotoksisitet som muligens ikke kan påvises i andre toksisitetsundersøkelser. Visse organiske fosforforbindelser har vist seg å forårsake forsinket nevrotoksisitet og bør undersøkes etter denne metoden.

Det kan benyttes *in vitro*-kartleggingsforsøk for å identifisere stoffer som kan forårsake forsinket polynevropati; negative resultater av *in vitro*-undersøkelser beviser imidlertid ikke at forsøksstoffet ikke er nevrotoksisk.

Dette 28-dagersforsøket for forsinket nevrotoksisitet gir opplysninger om mulige helserisikoer som kan følge av gjentatt eksponering i et begrenset tidsrom. Det vil gi opplysninger om forholdet dose/virkning og kan danne grunnlag for en vurdering av dosenivå uten observert skadevirkning (NOAEL), som kan være nyttig ved utarbeidingen av sikkerhetskriterier for eksponering.

Se også den generelle innledningen til del B.

#### 1.2. Definisjoner

*Organiske fosforforbindelser* omfatter uladete organofosforestere, tioestere eller anhydrider av organofosforsyrer, organofosfonsyrer og organofosforamidsyrer eller tilsvarende fosfortiosyrer, fosfontiosyrer og fosfortioamidsyrer, eller andre stoffer som kan forårsake den forsinkede nevrotoksisitet som til tider forekommer i denne stoffgruppen.

*Forsinket nevrotoksisitet* er et syndrom forbundet med langvarig, forsinket forekomst av ataksi, distal aksonopati i ryggmargen og perifere nerver og hemming og aldring av NTE (Neuropathy Target Esterase) i nervevev.

#### 1.3. Prinsipp for forsøksmetoden

Forsøksstoffet tilføres oralt til tamhøns daglig i 28 dager. Dyrene observeres minst daglig for unormal atferd, ataksi og lammelse til 14 dager etter siste dose. Biokjemiske analyser, særlig NTE-hemming (Neuropathy Target Esterase), foretas på tilfeldig utvalgte høns fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer etter siste dose. To uker etter siste tilførsel avlives resten av hønsene, og histopatologisk undersøkelse av utvalgt nervevev foretas.

#### 1.4. Beskrivelse av forsøksmetoden

##### 1.4.1. Forberedelser

Unge, sunne, voksne høns som er frie for forstyrrende virussykdommer og medisiner og avvikende gange, utvelges vilkårlig, fordeles i forsøks- og kontrollgrupper og tilvennes laboratorieomgivelsene i minst fem dager før forsøket begynner.

Det benyttes bur eller innhegninger som er store nok til at hønsene kan bevege seg fritt og deres gange observeres uhindret.

Forsøksstoffet tilføres oralt hver dag, sju dager i uken, fortrinnsvis ved tvangsføring eller med gelatinkapsler. Væsker kan tilføres ufortynnet eller løst i en egnet bærer, f.eks. maisolje; faste stoffer bør om mulig gis i løst form, siden store doser faste stoffer i gelatinkapsler ikke alltid absorberes effektivt. For ikke-vandige løsemidler skal bærerens toksiske kjennetegn være kjent; i motsatt fall bestemmes de før forsøket starter.

##### 1.4.2. Forsøksvilkår

###### 1.4.2.1. Forsøksdyr

Unge, voksne verpehøns (*Gallus gallus domesticus*), 8 til 12 måneder gamle, anbefales. Raser og stammer av standardstørrelse bør benyttes, og hønsene bør normalt være oppdrettet under forhold som tillot fri bevegelse.

#### 1.4.2.2. Antall og kjønn

Det bør benyttes minst tre forsøksgrupper og en kontrollgruppe som bare tilføres bæreren. Bærerkontrollgruppen behandles på samme måte som forsøksgruppen, med unntak av tilføring av forsøksstoffet.

Det benyttes tilstrekkelig mange høns i hver gruppe til at minst seks fugler kan avlives for biokjemisk bestemmelse (tre på hvert av to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 14 dager lange observasjonsperioden for patologisk undersøkelse.

#### 1.4.2.3. Dosenivåer

Ved valg av dosenivåer skal det tas hensyn til tre resultater fra et forsøk for forsinket nevrotoksisitet etter akutt eksponering og eventuelle andre tilgjengelige data om forsøksstoffets toksisitet eller kinetikk. Høyeste dosenivå velges med sikte på å framkalle toksiske virkninger, fortrinnsvis forsinket nevrotoksisitet, men uten død eller åpenbar lidelse. Deretter velges en fallende serie dosenivåer for påvisning av eventuelle doserelaterte reaksjoner og laveste dosenivå uten observert skadevirkning (NOAEL).

#### 1.4.2.4. Grenseforsøk

Dersom et forsøk foretas etter framgangsmåten beskrevet her med en forsøksdose på minst 1 000 mg/kg kroppsvekt per dag uten at det framkaller observerbare toksiske virkninger, og dersom toksisitet ikke kan forventes ut fra data om strukturelt beslektede stoffer, kan en undersøkelse med høyere dose betraktes som unødvendig. Grenseforsøket får anvendelse med mindre eksponering av mennesker viser et behov for å benytte et høyere dosenivå.

#### 1.4.2.5. Observasjonsperiode

Alle dyrene observeres minst daglig i eksponeringsperioden og i påfølgende 14 dager, med mindre en kontroll post mortem er bestemt.

#### 1.4.3. Framgangsmåte

Dyrene tilføres forsøksstoffet sju dager i uken i 28 dager.

##### 1.4.3.1. Generelle observasjoner

Observasjonen må starte umiddelbart etter eksponeringen. Alle høns observeres omhyggelig minst én gang daglig de 28 dagene behandlingen varer, og 14 dager etterpå, eller til fastsatt avlivning. Alle tegn på toksisitet registreres, herunder tidspunktet de viste seg, type, grad og varighet. Observasjonene bør omfatte, men ikke begrenses til, unormal atferd. Ataksi måles etter en tallskala med minst fire nivåer, og lammelse registreres. Hønsene tas ut av burene minst to ganger i uken og tvinges til motorisk aktivitet, for eksempel stigeclatring, for å lette observasjonen av små tegn på toksisitet. Døende dyr og dyr med alvorlig lidelse eller smerte fjernes umiddelbart fra forsøket, avlives humannt og kontrolleres post mortem.

##### 1.4.3.2. Kroppsvekt

Alle høns veies like før forsøksstoffet tilføres første gang og deretter minst ukentlig.

##### 1.4.3.3. Biokjemisk undersøkelse

Seks vilkårlig valgte høns fra hver av forsøksgruppene og bærerkontrollgruppene avlives få dager etter siste dose, og hjernen og den lumbale ryggmarg prepareres og undersøkes for NTE-hemming. Dessuten kan det være nyttig å preparere og undersøke isjiasnervevevet for NTE-hemming. Normalt avlives tre fugler i kontrollgruppen og hver av forsøksgruppene 24 timer etter siste tilførsel og tre 24 timer senere; dersom data fra undersøkelsen med akutt eksponering eller andre undersøkelser (f.eks. toksikokinetikk) viser at andre tidspunkter for avlivning etter siste tilførsel er å foretrekke, skal tidspunktene endres og det skal gis en begrunnelse for avgjørelsen.

Dersom det anses hensiktsmessig, kan det også foretas analyser av acetylcholinesterase (AChE) på prøvene. Imidlertid kan spontan reaktivering av acetylcholinesterase forekomme *in vivo*, som kan føre til at stoffets styrke som AChE-hemmer undervurderes.

#### 1.4.3.4. Kontroll post mortem

Kontroll post mortem av alle forsøksdyrene (avlivet som fastsatt eller fordi de var døende) skal omfatte observasjon av hjernens og ryggmargens utseende.

#### 1.4.3.5. Histopatologisk undersøkelse

Nervevev fra dyr som overlever observasjonsperioden og som ikke benyttes til biokjemiske undersøkelser, skal gjennomgå en mikroskopundersøkelse. Vevet fikseres *in situ* ved hjelp av perfusjonsteknikker. Snittene bør omfatte cerebellum (lengdesnitt langs midtlinjen), medulla oblongata, ryggmarg og perifere nerver. Ryggmargssnitt tas fra den øvre cervikale delen, midt i brysthulen og i det lumbosakrale området. Det tas snitt fra det distale området av tibialnerven og dens forgreninger til Musculus gastrocnemicus og av isjiasnerven. Snittene farges med hensiktsmessige myelin- og aksonspesifikke farger. Først foretas en mikroskopundersøkelse av konserverte vev fra alle dyrene i kontrollgruppen og høydosegruppen. Dersom det påvises virkninger i høydosegruppen, skal det foretas også en mikroskopundersøkelse av vev fra dyr i mellom- og lavdosegruppene.

### 2. DATA

Dersom resultatene for de valgte endepunktene i denne metoden (biokjemi, histopatologi og observasjon av atferd) er negative, kreves normalt ingen ytterligere undersøkelser for forsinket nevrotoksisitet. Ved tvetydige eller uklare resultater for endepunktene kan ytterligere undersøkelser være nødvendige.

Data skal angis for hvert enkelt dyr. Utover dette oppsummeres alle data i tabellform som for hver forsøksgruppe viser antall dyr ved begynnelsen av forsøket, antall dyr med skader, atferdsmessige eller biokjemiske virkninger, disse skadenes eller virkningenes type og grad og prosentdelen av dyr med hver enkelt type og grad av skade eller virkning.

Resultatene av denne undersøkelsen bør vurderes med hensyn til forekomst, grad og korrelasjon av atferdsmessige, biokjemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerte virkninger i de behandlede gruppene og kontrollgruppene.

Numeriske resultater evalueres etter egnede og anerkjente statistiske metoder. De statistiske metodene skal velges ved utformingen av undersøkelsen.

### 3. RAPPORTERING

#### Forsøksrapport

Forsøksrapporten skal om mulig inneholde følgende opplysninger:

##### *Forsøksdyr:*

- benyttet stamme,
- dyrenes antall og alder,
- dyrenes opprinnelse, bovilkår osv.,
- hvert enkelt dyrs vekt ved forsøkets begynnelse.

##### *Forsøksvilkår:*

- nærmere opplysninger om forsøksstoffets tilberedning, stabilitet og eventuelt homogenitet,
- begrunnelse for valg av bærer,
- nærmere opplysninger om tilførselen av forsøksstoffet,
- nærmere opplysninger om fôr- og vannkvalitet,
- begrunnelse for valg av dosenivå,
- angivelse av hvilke doser som er gitt, herunder nærmere opplysninger om bærer, volum og fysisk form til det tilførte stoffet,
- begrunnelse for valg av andre tidspunkter for biokjemisk analyse enn 24 og 48 timer etter siste tilførsel.



*Resultater:*

- data om kroppsvekt,
- data om toksiske reaksjoner etter gruppe, herunder dødelighet,
- dosenivå uten observert skadevirkning (NOAEL),
- de observerte kliniske virkninger art, grad og varighet (med opplysninger om reversibilitet),
- detaljert beskrivelse av alle biokjemiske metoder og resultatene,
- funn fra post mortem-kontrollen,
- detaljert beskrivelse av alle histopatologiske funn,
- statistisk behandling av resultatene, hvis relevant.

*Diskusjon av resultatene**Konklusjoner*4. **HENVISNINGER**

Denne metoden tilsvarer TG 419 fra OECD.»

---

## VEDLEGG V

- A. Avsnitt 8 og 9 i innholdsfortegnelsen i vedlegget skal lyde:
- «8. SPESIELLE TILFELLER: STOFFER
  - 8.1. Flyttbare gassbeholdere
  - 8.2. Gassbeholdere beregnet på propan, butan eller flytende petroleumsgass (LPG)
  - 8.3. Massive metaller
  - 8.4. Stoffe klassifisert med setning R 65
  - 9. SÆRLIGE TILFELLER: Preparater
  - 9.1. Preparater i gassform (gassblandinger)
  - 9.2. Gassbeholdere beregnet på preparater som inneholder odorisert propan, butan eller flytende petroleumsgass (LPG)
  - 9.3. Legeringer, preparater som inneholder polymerer, preparater som inneholder elastomerer
  - 9.4. Preparater klassifisert med R 65
  - 9.5. Organiske peroksider»
- B. Følgende innsettes i avsnitt 3.2.3 etter kriteriene for R 20, «Farlig ved innånding»:
- «R 65 Farlig: Kan gi lungeskade ved svelging
- Flytende stoffer og preparater som på grunn av sin lave viskositet utgjør en innåndingsfare for mennesker:
- a) Stoffe og preparater som inneholder alifatiske, alisykliske og aromatiske hydrokarboner i en samlet konsentrasjon på minst 10 % og med
    - en strømningstid på mindre enn 30 s i et 3 mm ISO-beger etter EN 535,
    - en kinematisk viskositet, målt med et kalibrert glasskapillarviskosimeter etter ISO-standard 3104/3105, på mindre enn  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s ved 40 °C, eller
    - en kinematisk viskositet, utledet av målinger med rotasjonsviskosimeter etter ISO-standard 3219, på mindre enn  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s ved 40 °C.
  - Merk: stoffer og preparater som oppfyller disse vilkårene, behøver ikke klassifiseres dersom de har en midlere overflatespenning større enn 25 mN/m ved 40 °C.
  - b) andre stoffer og preparater som ikke oppfyller kriteriene ovenfor, ut fra praktiske erfaringer hos mennesker.»
- C. Avsnitt 3.2.6.3 skal lyde:
- «3.2.6.3. Irritasjon av åndedrettsystemet
- Følgende risikosegning tildeles etter kriteriene gitt nedenfor:
- R 37 Irriterer luftveiene
- Stoffer og preparater som forårsaker alvorlig irritasjon i åndedrettsystemet, basert på
- praktiske observasjoner hos mennesker,
  - positive resultater fra egnede dyreforsøk.

## Kommentarer til bruken av R 37

Ved tolkning av praktiske observasjoner hos mennesker bør det skilles mellom virkninger som fører til klassifisering med R 48 (se nr. 3.2.4), og dem som fører til klassifisering med R 37. Vilkår som normalt fører til klassifisering med R 37, er reversible og vanligvis begrenset til de øvre luftveiene.

Positive resultater fra egnede dyreforsøk kan omfatte data oppnådd ved et generelt toksisitetstest, herunder histopatologiske data fra åndedrettsystemet. Data fra måling av eksperimentell bradypné kan også benyttes til vurdering av luftveisirritasjon.»

## D. Avsnitt 3.2.7, «Sensibilisering» skal lyde:

## «3.2.7. Sensibilisering

3.2.7.1. *Sensibilisering ved innånding*

Stoffer og preparater skal klassifiseres som sensibiliserende og tildeles symbolet «Xn», farebetegnelsen «Skadelig» og risikoenheten R 42 etter følgende kriterier:

## R 42 Kan forårsake sensibilisering ved innånding

- dersom det er fastslått at stoffet eller preparatet kan forårsake en bestemt overfølsomhet i luftveiene hos mennesker,
- dersom det foreligger positive resultater fra egnede dyreforsøk,
- dersom stoffet er et isocyanat, med mindre det foreligger bevis for at stoffet ikke forårsaker overfølsomhet i luftveiene.

## Kommentarer til bruken av R 42

## Påvisning av virkning hos mennesker

Dokumentasjon for at stoffet kan forårsake en bestemt overfølsomhet i luftveiene, baseres normalt på erfaring fra mennesker. I denne forbindelse ses overfølsomhet normalt som astma, men andre overfølsomhetsreaksjoner som rhinitt og alveolitt kommer også i betraktning. Tilstanden har klinisk karakter av en allergisk reaksjon. Det er imidlertid ikke nødvendig å påvise immunologiske mekanismer.

Ved vurdering av dokumentasjon fra eksponering av mennesker må det ved beslutning om klassifisering dessuten tas hensyn til følgende elementer i tillegg til samtlige fakta fra sykdomstilfellene:

- antall eksponerte individer,
- omfanget av eksponeringen.

## Dokumentasjonen nevnt ovenfor kan være

- tidligere kliniske sykdomsforhold og data fra egnede lungefunksjonsforsøk knyttet til eksponering for stoffet, bekreftet av annen understøttende dokumentasjon, som kan omfatte:
  - et strukturelt slektskap med stoffer som er kjent for å forårsake overfølsomhet i luftveiene,
  - et immunologisk *in vivo*-forsøk (f.eks. prikkforsøk),
  - et immunologisk *in vitro*-forsøk (f.eks. serologisk analyse),
  - undersøkelser som kan påvise andre spesifikke men ikke-immunologiske virkningsmekanismer, f.eks. gjentatt svak irritasjon, eller farmakologisk framkalte virkninger,
  - data fra positive bronkiale provokasjonsforsøk med stoffet foretatt etter anerkjente retningslinjer for bestemmelse av en spesifikk overfølsomhetsreaksjon.

Tidligere kliniske sykdomsforhold bør omfatte både medisinsk og yrkesmessig forhistorie, slik at forholdet mellom eksponering for et bestemt stoff og utvikling av overfølsomhet i luftveiene kan bestemmes. Relevante opplysninger omfatter forverrende faktorer både i hjemmet og på arbeidsplassen, sykdommens begynnelse og utvikling og vedkommende pasients familiebakgrunn og sykehistorie. Sykehistorien bør også omfatte et notat om andre allergiske forstyrrelser eller forstyrrelser i luftveiene fra barndommen av, samt røykevaner.

Resultatene av positive bronkiale provokasjonsforsøk anses som tilstrekkelig dokumentasjon for klassifisering som sensibiliserende. Det må midlertid fastslås at i praksis vil mange av undersøkelsene nevnt ovenfor allerede være foretatt.

Stoffer som framkaller symptomer på astma ved irritasjon bare hos personer med bronkial hyperreaktivitet, skal ikke tildeles R 42.

#### Dyreforsøk

Data fra forsøk som kan tyde på at et stoff har et potensial til å forårsake sensibilisering ved innånding hos mennesker, kan omfatte

- IgE-målinger (f.eks. hos mus),
- spesifikke lungereaksjoner hos marsvin.

#### 3.2.7.2. *Sensibilisering ved hudkontakt*

Stoffer og preparater skal klassifiseres som sensibiliserende og tildeles symbolet «Xi», farebetegnelsen «Irriterende» og risikosekningen R 43 etter følgende kriterier:

##### R 43 Kan forårsake allergi ved hudkontakt

- dersom praktisk erfaring viser at stoffet eller preparatet kan forårsake sensibilisering ved hudkontakt hos et betydelig antall personer,
- dersom det foreligger positive resultater fra et egnet dyreforsøk.

##### Kommentarer til bruken av R 43

##### Dokumentasjon fra mennesker

Følgende dokumentasjon (praktisk erfaring) er tilstrekkelig til å klassifisere et stoff med R 43:

- positive data fra egnede lappeforsøk, vanligvis fra flere enn én hudklinikk, eller
- epidemiologiske undersøkelser som viser allergisk kontaktdermatitt forårsaket av stoffet. Situasjoner der en høy andel av de eksponerte personer viser karakteristiske symptomer, skal betraktes med særlig alvor, selv om antallet tilfeller er lavt, eller
- positive data fra eksperimentelle undersøkelser hos mennesker (se også 3.1.1).

Følgende dokumentasjon er tilstrekkelig for å klassifisere et stoff med R 43 når det foreligger understøttende dokumentasjon:

- isolerte tilfeller av allergisk kontaktdermatitt, eller
- epidemiologiske undersøkelser der tilfeldigheter, ensidighet eller sammenblanding ikke kan utelukkes med en rimelig grad av sikkerhet.

##### Understøttende dokumentasjon kan omfatte

- data fra dyreforsøk foretatt etter anerkjente retningslinjer, med et resultat som ikke oppfyller kriteriene gitt i avsnittet om dyreforsøk, men som er tilstrekkelig nær kriteriene til å anses som signifikante, eller
- data fra ikke-standardiserte metoder, eller
- egnede forhold struktur-aktivitet.

## Dyreforsøk

Som positive resultater fra egnede dyreforsøk anses følgende:

For forsøksmetoden med hjelpestoff for hudsensibilisering beskrevet i vedlegg V eller for andre forsøksmetoder med hjelpestoff anses en reaksjon hos minst 30 % av dyrene som positiv. For andre forsøksmetoder anses en reaksjon hos minst 15 % av dyrene som positiv.

3.2.7.3. *Immunologisk kontakturticaria (elveblest)*

Noen stoffer som oppfyller kriteriene for R 42 kan i tillegg forårsake immunologisk kontakturticaria. I slike tilfeller bør opplysninger om kontakturticaria inkluderes med egnede S-setninger, vanligvis S 24 og S 36/37, og nevnes i sikkerhetsdatabladet.

For stoffer som gir tegn på immunologisk kontakturticaria og som ikke oppfyller kriteriene for R 42, bør klassifisering med R 43 vurderes.

Det finnes ingen anerkjent dyremodell for å bestemme stoffer som forårsaker immunologisk kontakturticaria. Derfor baseres klassifiseringen normalt på dokumentasjon av virkninger hos mennesker som svarer til dem for hudsensibilisering (R 43).

## 3.2.7.4. Merk at dersom symbolet «Xn» og farebetegnelsen «Skadelig» er tildelt, er symbolet «Xi» og farebetegnelsen «Irriterende» valgfrie.»

## E. Kriteriene for S 62 i avsnitt 6 skal lyde:

«S 62 Ved svelging må framkalling av breknings unngås: Kontakt lege umiddelbart og vis fram denne beholderen eller etiketten.

— Anvendelse:

— for stoffer og preparater som er klassifisert som skadelige med R 65 etter kriteriene gitt i avsnitt 3.2.3,

— ikke for stoffer og preparater som markedsføres i aerosolbeholdere (eller beholdere utstyrt med en forseglet forstøvingsinnretning), se avsnitt 8 og 9.

— Kriterier for bruk:

— obligatorisk for stoffer og preparater nevnt ovenfor dersom de selges til, eller vil kunne benyttes av, allmennheten,

— anbefalt for ovennevnte stoffer og preparater dersom de benyttes i industrien.»

## F. Følgende avsnitt innsettes i avsnitt 8:

«8.2. **Gassbeholdere beregnet på propan, butan eller flytende petroleumsgass (LPG)**

Disse stoffene er klassifisert i vedlegg I. Selv om de er klassifisert i samsvar med artikkel 2, utgjør de ingen fare for menneskers helse når de markedsføres i lukkede, gjenfyllbare flasker eller i engangsbeholdere etter EN 417 som brenngasser som bare slippes ut ved forbrenning.

Disse flaskene eller beholderne skal merkes med relevant symbol og R- og S-setninger for brannfare. Det kreves ingen opplysninger på etiketten om virkninger på menneskers helse. Opplysninger om virkninger på menneskers helse som skulle ha stått på etiketten, skal imidlertid formidles til den yrkesmessige bruker av vedkommende som er ansvarlig for markedsføringen av stoffet, i formatet fastsatt i artikkel 27 i dette direktiv. For forbrukerne skal det formidles tilstrekkelige opplysninger til at de kan treffe alle nødvendige tiltak med henblikk på helse og sikkerhet, som fastsatt i artikkel 1 nr. 3 i direktiv 91/155/EØF, som endret ved direktiv 93/112/EØF.»

G. Overskriften til avsnitt «8.2. Massive metaller» skal lyde:

«8.3. **Massive metaller**»

H. Følgende avsnitt innsettes i avsnitt 8:

«8.4. **Stoffer klassifisert med R 65**

Stoffer klassifisert som skadelige på grunn av fare ved innånding, behøver ikke merkes som skadelige med R 56 når de markedsføres i aerosolbeholdere eller beholdere utstyrt med en forseglet forstøvingsinnretning.»

I. Nr. 9.1.3 skal lyde:

«9.1.3. **Merking**

For flyttbare gassbeholdere anses kravene til merking å være oppfylt når de er i samsvar med artikkel 8 nr. 5 bokstav b) i direktiv 88/379/EØF.

Som unntak fra artikkel 8 nr. 1 og 2 kan formatet til og dimensjonene på etiketten for gassbeholdere med en kapasitet på inntil 150 liter vann, oppfylle kravene i ISO-standard 7225. I dette tilfelle kan etiketten være påført preparatets alminnelige betegnelse eller industri-/handelsbetegnelse, forutsatt at navnet på de farlige stoffene som inngår som bestanddeler i preparatet, er tydelig angitt på en måte som ikke kan slettes på selve gassbeholderen.

Opplysningene gitt i artikkel 7 kan gjengis på en holdbar plate eller etikett som er godt festet til beholderen.»

J. Følgende avsnitt innsettes i avsnitt 9:

«9.2. **Gassbeholdere beregnet på preparater som inneholder odorisert propan, butan eller flytende petroleumsgass (LPG)**

Propan, butan og flytende petroleumsgass er klassifisert i vedlegg I. Selv om preparater som inneholder disse stoffene, er klassifisert i samsvar med artikkel 3 i direktiv 88/379/EØF, utgjør de ingen fare for menneskers helse når de markedsføres i lukkede, gjenfyllbare flasker eller i engangsbeholdere etter EN 417 som brenngasser som bare slippes ut ved forbrenning.

Disse flaskene eller beholderne skal merkes med relevant symbol og R- og S-setninger for brannfare. Det kreves ingen opplysninger på etiketten om virkninger på menneskers helse. Opplysninger om virkninger på menneskers helse som skulle ha stått på etiketten, skal imidlertid formidles til den yrkesmessige bruker av vedkommende som er ansvarlig for markedsføringen av stoffet, i formatet fastsatt i artikkel 10 i direktiv 88/379/EØF. For forbrukerne skal det formidles tilstrekkelige opplysninger til at de kan treffe alle nødvendige tiltak med henblikk på helse og sikkerhet, som er fastsatt i artikkel 1 nr. 3 i direktiv 91/155/EØF.»

K. Overskriften «9.2. Legeringer, preparater som inneholder polymerer, preparater som inneholder elastomerer» skal lyde:

«9.3. **Legeringer, preparater som inneholder polymerer, preparater som inneholder elastomerer**»

L. Følgende tilføyes i avsnitt 9:

«9.4. **Preparater klassifisert med R 65**

Preparater klassifisert som skadelige på grunn av fare ved innånding, behøver ikke merkes som skadelige med R 56 når de markedsføres i aerosolbeholdere eller beholdere utstyrt med en forseglet forstøvingsinnretning.»

M. Overskriften «9.4. Organiske peroksider» skal lyde:

«9.5. **Organiske peroksider**»