

I	EES-STOFNANIR	
1.	EES-ráðið	
2.	Sameiginlega EES-nefndin	
2007/EES/54/01	Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2004/55/EB frá 20. apríl 2004 um breytingu á tilskipun ráðsins 66/401/EBE um markaðssetningu fôðurjurtafraja.	1
2007/EES/54/02	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/371/EB frá 20. apríl 2004 um skilyrði fyrir markaðssetningu fræblandna sem nota á til ræktunar fôðurjurtar (<i>tilkynnt með númeri C(2004) 1429</i>).	2
2007/EES/54/03	Tilskipun evrópuþingsins og ráðsins 2003/102/EB frá 17. nóvember 2003 um vernd fôtgangandi og annarra óvarinna vegfarenda í undanfara árekstrar og við árekstur við vélknúið ökutæki og um breytingu á tilskipun ráðsins 70/156/EBE	3
2007/EES/54/04	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/90/EB frá 23. desember 2003 um tækniforskriftir fyrir framkvæmd 3. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/102/EB um vernd fôtgangandi og annarra óvarinna vegfarenda í undanfara árekstrar og við árekstur við vélknúið ökutæki og um breytingu á tilskipun 70/156/EBE (<i>tilkynnt með númeri C(2003) 5041</i>)	14
2007/EES/54/05	Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 608/2004 frá 31. mars 2004 um merkingu matvæla og innihaldsefna matvæla með viðbættum jurtasterólum, jurtasterólestrum, jurtastanólum og/eða jurtastanólestrum.	62
2007/EES/54/06	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/429/EB frá 29. apríl 2004 um breytingu á ákvörðunum 97/830/EB, 2000/49/EB, 2002/79/EB og 2002/80/EB að því er varðar þá komustaði þar sem einungis má flytja viðkomandi vörur inn í Bandalagið (<i>tilkynnt með númeri C(2004) 1594</i>)	64
2007/EES/54/07	Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2004/77/EB frá 29. apríl 2004 um breytingu á tilskipun 94/54/EB að því er varðar merkingu tiltekinna matvæla sem innihalda glýsyrrisinsýru og ammoníumsalt hennar.	78
2007/EES/54/08	Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2004/73/EB frá 29. apríl 2004 um tuttugustu og níundu aðlögun að tækniframförum á tilskipun ráðsins 67/548/EBE um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna.	80
2007/EES/54/09	Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2032/2003 frá 4. nóvember 2003 um annan áfanga 10 ára vinnuáætlunarinnar, sem um getur í 2. mgr. 16. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 98/8/EB um markaðssetningu sæfiefna, og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1896/2000	225

2007/EES/54/10	Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2003/112/EB frá 1. desember 2003 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE í því skyni að bæta við virka efninu parakvati	321
2007/EES/54/11	Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2003/119/EB frá 5. desember 2003 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE í því skyni að bæta við virku efnunum mesósúlfüroni, própoxýkarbasoni og soxamíði	325
2007/EES/54/12	Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2003/82/EB frá 11. september 2003 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE að því er varðar staðlaðar setningar um sérstaka áhættu og varúðarráðstafanir varðandi plöntuvarnarefni	328
2007/EES/54/13	Reglugerð evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 2422/2001 frá 6. nóvember 2001 um áætlun Bandalagsins varðandi orkunýtnimerkingar á skrifstofubúnaði	346
2007/EES/54/14	Ákvörðun nr. 192 frá 29. október 2003 um skilyrði fyrir framkvæmd b-liðar 1. mgr. 50. gr. reglugerðar ráðsins (EBE) nr. 574/72 (2004/324/EB).	352
2007/EES/54/15	Ákvörðun nr. 193 frá 29. október 2003 um meðferð lífeyriskrafna (2004/325/EB)	361
2007/EES/54/16	Ákvörðun nr. 194 frá 17. desember 2003 um samræmda beitingu i-liðar a-liðar 1. mgr. 22. gr. reglugerðar ráðsins (EBE) nr. 1408/71 í dvalarríkinu (2004/327/EB)	363
2007/EES/54/17	Tilmæli nr. 23 frá 29. október 2003 um meðferð lífeyriskrafna (2004/326/EB)	365
2007/EES/54/18	Ákvörðun nr. 195 frá 23. mars 2004 um samræmda beitingu i-liðar a-liðar 1. mgr. 22. gr. reglugerðar (EBE) nr. 1408/71 að því er varðar heilsugæslu í tengslum við meðgöngu og barnsburð (2004/481/EB).	367
2007/EES/54/19	Ákvörðun nr. 196 frá 23. mars 2004 samkvæmt a-lið 1. mgr. 22. gr. (2004/482/EB).	368
2007/EES/54/20	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/332/EB frá 2. apríl 2004 um beitingu tilskipunar ráðsins 72/166/EBE að því er varðar eftirlit með ábyrgðartryggingu vélknúinna ökutækja (<i>tilkynnt með númeri C(2004) 1235</i>)	370
2007/EES/54/21	Reglugerð evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 261/2004 frá 11. febrúar 2004 um sameiginlegar reglur um skaðabætur og aðstoð til handa farþegum sem er neitað um far og þegar flugi er aflýst eða mikil seinkun verður og um að fella úr gildi reglugerð (EBE) nr. 295/91.	371
2007/EES/54/22	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/224/EB frá 20. febrúar 2004 um tilhögun við framlagningu upplýsinga um skipulags- eða framkvæmdaáætlanir sem krafist er samkvæmt tilskipun ráðsins 96/62/EB með tilliti til viðmiðunarmarka fyrir tiltekin mengunarefni í andrúmslofti (<i>tilkynnt með númeri C(2004) 491</i>)	378
2007/EES/54/23	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2004/461/EB frá 29. apríl 2004 um spurningalista sem nota skal í tengslum við árlega skýrslugjöf um mat á gæðum andrúmslofts samkvæmt tilskipunum ráðsins 96/62/EB og 1999/30/EB og samkvæmt tilskipunum Evrópuþingsins og ráðsins 2000/69/EB og 2002/3/EB (<i>tilkynnt með númeri C(2004) 1714</i>)	385
2007/EES/54/24	Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2002/990/EB frá 17. desember 2002 til frekari skýringar á viðauka A við reglugerð ráðsins (EB) nr. 2223/96 að því er varðar meginreglur um mælingar á verði og magni í þjóðhagsreikningum (<i>tilkynnt með númeri C(2002) 5054</i>)	414
2007/EES/54/25	Reglugerð evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 808/2004 frá 21. apríl 2004 um hagskýrslur Bandalagsins um upplýsingasamfélagið	432

2007/EES/54/26	Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1725/2003 frá 29. september 2003 um innleiðingu tiltekinnar, alþjóðlegra reikningsskilastaðla í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1606/2002	439
2007/EES/54/27	Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 707/2004 frá 6. apríl 2004 um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1725/2003 um innleiðingu tiltekinnar alþjóðlegra reiknings-skilastaðla í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1606/2002.	859
2007/EES/54/28	Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 773/2004 frá 7. apríl 2004 um málsmeðferð framkvæmdastjórnarinnar skv. 81. og 82. gr. EB-sáttmálans.	874

3. Sameiginlega EES-þingmannanefndin

4. Ráðgjafarnefnd EES

II EFTA-STOFNANIR

1. Fastanefnd EFTA-ríkjanna

2. Eftirlitsstofnun EFTA

3. EFTA-dómstóllinn

III EB-STOFNANIR

1. Ráðið

2. Framkvæmdastjórnin

3. Dómstóllinn

EES-STOFNANIR

SAMEIGINLEGA EES-NEFNDIN

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 2004/55/EB

2007/EES/54/01

frá 20. apríl 2004

um breytingu á tilskipun ráðsins 66/401/EBE um markaðssetningu fódurjurtafræja (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 66/401/EBE frá 14. júní
1966 um markaðssetningu fódurjurtafræja ⁽¹⁾, einkum
1. mgr. a í 2. gr. og 21. gr. a,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í tilskipun 66/401/EBE er skrá yfir ættkvíslir og tegundir plantna sem teljast til fódurjurta í skilningi þeirrar tilskipunar. Í þeirri skrá eru blendingar sem koma fram við víxl hávinguls (*Festuca pratensis* Hudson) og ítalsks rýgresis (*Lolium multiflorum* Lam).
- 2) Rýmka skal gildissvið tilskipunar 66/401/EBE þannig að hún nái yfir blendinga *Festuca* spp. og *Lolium* spp.
- 3) Með framangreindri tilskipun er, að teknu tilliti til þeirra skilyrða sem fræ verður að uppfylla, kveðið á um lágmarksspírunarhæfni (% af hreinu fræi) fyrir hestabaunafræ (*Vicia faba* L.).
- 4) Lágmarksspírunarhæfni hestabaunafræ (*Vicia faba* L.), sem næst nú í Bandalaginu, er minni en krafa er gerð um í tilskipun 66/104/EBE.
- 5) Því ber að breyta tilskipun 66/401/EBE til samræmis við þetta.
- 6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um fræ og fjölgunarefni í landbúnaði, garðyrkju og skógrækt.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Eftirfarandi breytingar eru gerðar á tilskipun 66/401/EBE:

1. í stað orðanna í a-lið A-hluta 1. mgr. 2. gr.

„*Festuca pratensis* Hudson x
Lolium multiflorum Lam.

Blendingur sem kemur
fram við víxl hávinguls
og ítalsks rýgresis
(þ.m.t. Westerwold-rý-
gresi) (x *Festulolium*)“
komi eftirfarandi orð:

Blendingar sem koma fram
„*Festuca* spp. x *Lolium* spp. við víxl tegunda af ætt-
kvíslinni *Lolium* (x *Festu-
lolium*)“

2. Ákvæðum II. og IV. viðauka er breytt sem hér segir:

a) Í 2. dálki í töflunni í lið I.2.A í II. viðauka komi „80“ í stað „85“ í færslunni sem varðar *Vicia faba*.

b) Í 4. lið a-liðar og 4. lið c-liðar í I-lið A-liðar í IV. viðauka bætist eftirfarandi málslíður við:

„Þegar um er að ræða x *Festulolium* skal tilgreina nafn tegundanna innan ættkvíslanna *Festuca* og *Lolium*“

2. gr.

1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 30. september 2004. Þau skulu þegar í stað senda framkvæmdastjórninni texta þessara ákvæða og samsvörunar-töflu milli viðkomandi ákvæða og þessarar tilskipunar.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessi ákvæði skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þau eru birt opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

2. Aðildarríkin skulu senda framkvæmdastjórninni helstu ákvæði úr landslögum sem þau samþykkja um málefni sem tilskipun þessi tekur til.

3. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 20. apríl 2004.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 114, 21.4.2004, bls. 18. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 161/2004 frá 3. desember 2004 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn, sjá EES-viðbætur við Stjórnartíðindi Evrópu-sambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 1.

(¹) Stjtið. EB 125, 11.7.1966, bls. 2298/66. Tilskipuninni var síðast breytt með tilskipun 2003/61/EB (Stjtið. EB L 165, 3.7.2003, bls. 23).

ÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

2007/EES/54/02

frá 20. apríl 2004

um skilyrði fyrir markaðssetningu fræblandna sem nota á til ræktunar fódurjurta (*)

(tilkynnt með númeri C(2004) 1429)

(2004/371/EB)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA HEFUR,
með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 66/401/EBE frá 14. júní 1966
um markaðssetningu fódurjurtafræja ⁽¹⁾, einkum þriðju
undirgrein 1. mgr. 13. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Samkvæmt tilskipun 66/401/EBE er heimilt að setja á markað fræblöndur sem nota á til ræktunar fódurjurta ef hinir ýmsu efnisþættir blöndunnar uppfylla, til viðbótar ákvæðum um lokun og merkingu umbúðanna, gildandi reglur Bandalagsins um markaðssetningu þeirra fyrir blöndun.
- 2) Til að tryggja frjálsan flutning á fræblöndum, sem nota á til ræktunar fódurjurta, ber að ákveða skilyrði fyrir framleiðslu, skoðun á framleiðslu og merkingu slíkra blandna.
- 3) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari ákvörðun, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um fræ og fjölgunarefni í landbúnaði, garðyrkju og skógrækt.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Í þessari ákvörðun er kveðið á um skilyrði fyrir framleiðslu, skoðun á framleiðslu og merkingu fræblandna sem ætlaðar eru til ræktunar fódurjurta til viðbótar þeim skilyrðum sem sett eru fram í tilskipun 66/401/EBE.

2. gr.

Aðildarríkin skulu krefjast þess að fyrirtæki sem framleiða fræblöndur:

- a) hafi sett upp blöndunarbúnað sem tryggir einsleitni fullunninnar blöndu,
- b) noti viðeigandi aðferðir við alla blöndunarstarfsemi,
- c) feli einum starfsmanni beina ábyrgð á blöndunarstarfseminni,

- d) haldi skrá yfir fræblöndur sem nota á til ræktunar fódurjurta.

3. gr.

Fyrirtæki sem hyggjast framleiða fræblöndur skulu tilkynna yfirvaldinu, sem um getur í 2. lið c-liðar í I. þætti A-hluta í IV. viðauka við tilskipun 66/401/EBE, eftirfarandi:

- a) samsetningu ýmissa efnisþátta, í hundraðshlutum eftir þyngd, sundurliðað eftir tegundum og, þar sem við á, eftir yrkjum.
- b) heiti blöndunnar þegar fyrirhugað er að merkja umbúðirnar með því.

4. gr.

1. Yfirvaldið sem um getur í 3. gr. skal annast eftirlit með framleiðslu fræblandna.

2. Eftirlitið skal taka til:

- a) eftirlits með auðkenni og heildarþunga hvers efnisþáttar, a.m.k. með slembiathugunum á opinberum merkimiðum sem auðkenna fræumbúðirnar, og
- b) slembiathugana á blöndunarstarfseminni, þ.m.t. fullunnum blöndum.

5. gr.

Ítarlegar upplýsingar um notkun til ræktunar fódurplantna skulu koma fram á opinbera merkimiðanum og/eða merkimiða birgis.

6. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 20. apríl 2004.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 116, 22.4.2004, bls. 39. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 161/2004 frá 3. desember 2004 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 1.

(¹) Stjtið. EB 125, 11.7.1966, bls. 2298/66. Tilskipuninni var síðast breytt með tilskipun 2003/61/EB (Stjtið. ESB L 165, 3.7.2003, bls. 23).

TILSKIPUN EVRÓPUÞINGSINS OG RÁÐSINS 2003/102/EB

2007/EES/54/03

frá 17. nóvember 2003

um vernd fótgangandi og annarra óvarinna vegfarenda í undanfara árekstrar og við árekstur við vélknúð ökutæki og um breytingu á tilskipun ráðsins 70/156/EEB (*)

EVROÞUÞINGIÐ OG RÁÐ EVRÓPUSAMBANDSINS HAFA,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins, einkum 95. gr.,

með hliðsjón af tillögu framkvæmdastjórnarinnar,

með hliðsjón af álitum efnahags- og félagsmálanefndar Evrópubandalaganna ⁽¹⁾,

í samræmi við málsmæðferðina sem mælt er fyrir um í 251. gr. sáttmálans ⁽²⁾,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Til þess að fækka þeim sem slasast í umferðarslysum í Bandalaginu er nauðsynlegt að innleiða ráðstafanir til að auka vernd fótgangandi og annarra óvarinna vegfarenda í undanfara árekstrar og við árekstur við framenda vélknúins ökutækis.
- 2) Innan aðgerðaáætlunarinnar um umferðaröryggi er brýn þörf á röð óbeinna og virkra ráðstafana (varna slysum og draga úr afleiðingum slysa með því að draga úr umferðarhraða og bæta grunnvirki) til að bæta öryggi óvarinna vegfarenda, svo sem gangandi vegfarenda, hjólréiðamanna og ökumanna bifhjóla.
- 3) Innri markaðurinn myndar svæði án landamæra þar sem tryggja verður frjálsa vöruflutninga, frjálsa för fólks, frjálsa þjónustustarfsemi og frjálsa fjármagnsflutninga og í þeim tilgangi er gerðarviðurkenningar kerfi Bandalagsins fyrir ökutæki til staðar. Tæknilegar kröfur vegna gerðarviðurkenningar vélknúinna ökutækja með tilliti til verndar fótgangandi vegfarenda skulu samræmdar til að koma í veg fyrir að samþykktar verði mismunandi kröfur í aðildarríkjum og til að tryggja eðlilega starfsemi innri markaðarins.
- 4) Hægt er að ná markmiðum um vernd gangandi vegfarenda með því að gera í senn virkar og óbeinar öryggisráðstafanir. Tilmæli Evrópunefndarinnar um aukið öryggi ökutækja (EEVC) frá júní 1999 hafa hlotið viðtækt samþykki á þessu sviði. Í þessum tilmælum eru settar fram kröfur um framhluta ökutækja í tilteknum flokkum vélknúinna ökutækja þannig að dragi úr slyshættu af völdum þeirra. Í þessari tilskipun eru settar fram prófanir og viðmiðunarmörk sem byggjast á tilmælum Evrópunefndarinnar um aukið öryggi ökutækja.
- 5) Framkvæmdastjórnin skal skoða hvort gerlegt er að rýmka gildissvið þessarar tilskipunar þannig að hún taki til ökutækja með hámarks massa allt að 3,5 tonnum og gefa skýrslu um niðurstöður sínar til Evrópuþingsins og ráðsins.

6) Líta ber á þessa tilskipun sem þátt í viðtækari röð ráðstafana sem Bandalagið, iðnaðurinn og viðkomandi yfirvöld aðildarríkjanna grípa til varðandi vegfarendur, ökutæki og grunnvirki, með hliðsjón af miðlun upplýsinga um bestu starfsvenjur, til þess að auka öryggi vegfarenda og annarra óvarinna vegfarenda fyrir árekstur (virkar), við árekstur (óbeinar) og eftir árekstur.

7) Í ljósi þess hversu hröð tækniþróunin er á þessu sviði getur iðnaðurinn gert tillögu um aðrar ráðstafanir - annaðhvort óbeinar eða sambland af virkum og óbeinum ráðstöfunum – sem skila a.m.k. sama árangri og kröfur þessarar tilskipunar og skulu þær metnar í kjölfar gerleikaathugunar, sem framkvæmd er af óháðum sérfræðingum eigi síðar en 1. júlí 2004. Innleiðing annarra ráðstafanna, sem skila a.m.k. sama raunárangri, krefst þess að tilskipun þessi verði aðlöguð eða henni breytt.

8) Vegna yfirstandandi rannsókna og tækniframfara á sviði verndar fótgangandi vegfarenda er rétt að innleiða vissan sveigjanleika á þessu sviði. Til samræmis við það skal setja í þessari tilskipun grundvallarákvæði um vernd fótgangandi vegfarenda í formi prófana sem nýjar gerðir ökutækja og ný ökutæki þurfa að uppfylla. Tæknilegu forskriftirnar vegna framkvæmdar á slíkum prófunum skulu samþykktar með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar.

9) Hin hraða tækniframþróun í virkum öryggisráðstöfunum merkir að kerfi til að draga úr áhrifum árekstra og til að sporna gegn árekstrum geta aukið öryggi til muna, t.d. með því að draga úr hraða í árekstri og breyta höggstefnu. Í þessari tilskipun skal hvatt til þróunar slíkrar tækni.

10) Samtökin, sem eru í forsvari fyrir evrópska, japanska og kóreska framleiðendur vélknúinna ökutækja, hafa skuldbundið sig til að beita tilmælum Evrópunefndar um aukið öryggi ökutækja varðandi viðmiðunarmörk og prófanir, eða gera aðrar viðurkenndar ráðstafanir sem hafa a.m.k. jafngild áhrif, frá og með 2010 og beita fyrstu viðmiðunarmörkum og prófunum frá og með 2005 fyrir nýjar gerðir ökutækja og að beita fyrstu röð prófana á 80% allra nýrra ökutækja frá og með 1. júlí 2010, á 90% allra nýrra ökutækja frá og með 1. júlí 2011 og á öll ný ökutæki frá 31. desember 2012.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 321, 6.12.2003, bls. 15. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 162/2004 frá 3. desember 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 3.

⁽¹⁾ Stjtið. ESB C 234, 30.9.2003, bls. 10.

⁽²⁾ Álit Evrópuþingsins frá 3. júlí 2003 (hefur enn ekki verið birt í Stjórnartíðindum EB) og ákvörðun ráðsins frá 4. nóvember 2003 (hefur enn ekki verið birt í Stjórnartíðindum EB).

- 11) Tilskipun þessi skal jafnframt stuðla að því að koma á öflugri vernd í tengslum við alþjóðlega samhæfingu löggjafar á þessu sviði sem hófst með samningi Sameinuðu þjóðanna og efnahagsnefndar Evrópu frá 1998 varðandi setningu heildartæknireglugerða fyrir ökutæki á hjólum, búnað og hluta sem heimilt er að koma fyrir og/eða nota í ökutækjum á hjólum.
- 12) Tilskipun þessi er ein sértilskipananna sem ber að fara eftir til þess að gæta samræmis við EB-gerðarviðurkenningaraðferðina, sem komið var á fót með tilskipun ráðsins 70/156/EBE frá 6. febrúar 1970 um samræmingu laga aðildarríkjanna um gerðarviðurkenningu á vélknúnum ökutækjum og eftirvögnum þeirra ⁽¹⁾.
- 13) Breyta ber tilskipun 70/156/EBE til samræmis við þetta.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

1. Þessi tilskipun gildir um yfirborð framhluta ökutækja. Í þessari tilskipun merkir „ökutæki“ öll vélknúin ökutæki, eins og þau eru skilgreind í 2. gr. og II. viðauka við tilskipun 70/156/EBE, í flokki M₁ með hámarks massa, sem er ekki meiri en 2,5 tonn, og ökutæki í flokki N₁ sem eru byggð á ökutækjum í flokki M₁, með hámarks massa sem er ekki meiri en 2,5 tonn.

2. Markmiðið með þessari tilskipun er að draga úr meiðslum fótgangandi og annarra óvarinna vegfarenda sem verða fyrir framhluta þeirra ökutækja sem skilgreind eru í 1. mgr.

2. gr.

1. Frá og með 1. janúar 2004 er engu aðildarríki heimilt, af ástæðum sem varða vernd fótgangandi vegfarenda:

- að synja um EB-gerðarviðurkenningu eða innlenda gerðarviðurkenningu fyrir gerð ökutækis eða
- að banna að ökutæki verði skráð, seld eða tekin í notkun,

að því tilskildu að ökutækin uppfylli tæknilegu ákvæðin sem sett eru fram í liðum 3.1. eða 3.2 í I. viðauka.

2. Frá og með 1. október 2005 skulu aðildarríkin ekki lengur veita:

- EB-gerðarviðurkenningu eða
- innlenda gerðarviðurkenningu,

nema á grundvelli ákvæða 2. mgr. 8. gr. í tilskipun 70/156/EBE, fyrir allar gerðir ökutækja af ástæðum sem varða vernd fótgangandi vegfarenda ef tæknilegu ákvæðin, sem sett eru fram í liðum 3.1 eða 3.2 í I. viðauka, hafa ekki verið uppfyllt.

3. Ákvæði 2. mgr. gilda ekki um ökutæki sem, með tilliti til grunnþátta í byggingu og hönnun yfirbyggingarinnar fyrir framan A-stoðirnar, eru ekki frábrugðin

gerðum ökutækja sem veitt hefur verið EB-gerðarviðurkenning eða innlend gerðarviðurkenning fyrir 1. október 2005 og sem hafa ekki þegar verið viðurkennd samkvæmt þessari tilskipun.

4. Frá og með 1. september 2010 skulu aðildarríkin ekki lengur veita:

- EB-gerðarviðurkenningu eða
- innlenda gerðarviðurkenningu,

nema á grundvelli ákvæða 2. mgr. 8. gr. í tilskipun 70/156/EBE, fyrir allar gerðir ökutækja, af ástæðum sem varða vernd fótgangandi vegfarenda, ef tæknilegu ákvæðin sem sett eru fram í lið 3.2 í I. viðauka við þessa tilskipun hafa ekki verið uppfyllt.

5. Frá og með 31. desember 2012 skulu aðildarríkin:

- líta svo á að samræmisvottorð, sem fylgja nýjum ökutækjum í samræmi við ákvæði tilskipunar 70/156/EBE, gildi ekki lengur að því er varðar 1. mgr. 7. gr. þeirrar tilskipunar og
- banna að ný ökutæki verði skráð, seld og tekin í notkun ef þeim fylgja ekki samræmisvottorð í samræmi við tilskipun 70/156/EBE,

af ástæðum sem varða vernd fótgangandi vegfarenda ef tæknilegu ákvæðin, sem sett eru fram í liðum 3.1 eða 3.2 í I. viðauka, hafa ekki verið uppfyllt.

6. Frá og með 1. september 2015 skulu aðildarríkin:

- líta svo á að samræmisvottorð, sem fylgja nýjum ökutækjum í samræmi við ákvæði tilskipunar 70/156/EBE, gildi ekki lengur að því er varðar 1. mgr. 7. gr. þeirrar tilskipunar og
- banna að ný ökutæki verði skráð, seld og tekin í notkun ef þeim fylgja ekki samræmisvottorð í samræmi við tilskipun 70/156/EBE,

af ástæðum sem varða vernd fótgangandi vegfarenda ef tæknilegu ákvæðin, sem sett eru fram í lið 3.2 í I. viðauka, hafa ekki verið uppfyllt.

3. gr.

Með fyrirvara um ákvæðin í 2. gr. skulu aðildarríkin sjá til þess að prófanirnar, sem mælt er fyrir um í liðum 3.1. eða 3.2 í I. viðauka, séu gerðar í samræmi við tækniforskriftirnar sem skulu tilgreindar í ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar.

4. gr.

Í hverjum mánuði skulu viðurkenningaryfirvöld aðildarríkjanna senda framkvæmdastjórninni afrit af gerðarviðurkenningarvottorði, en fyrirmynd að því er að finna í 2. viðbæti við II. viðauka, fyrir hvert ökutæki sem þau hafa viðurkennt í samræmi við þessa tilskipun í þeim mánuði.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L 42, 23.2.1970, bls. 1. Tilskipuninni var síðast breytt með reglugerð (EB) nr. 807/2003 (Stjtið. ESB L 122, 16.5.2003, bls. 36).

5. gr.

1. Framkvæmdastjórnin skal á grundvelli viðeigandi upplýsinga, sem viðurkenningaryfirvöld og hagsmunaaðilar senda henni, sem og óháðra athugana, vakta framþróun iðnaðarins að því er varðar vernd fótgangandi vegfarenda og skal framkvæma eigi síðar en 1. júlí 2004 óháð gerleikamat að því er varðar ákvæði liðar 3.2 í I. viðauka og einkum aðrar ráðstafanir – annaðhvort óbeinar eða sambland af virkum og óbeinum ráðstöfunum – sem skila a.m.k. sama raunárangri. Gerleikaathugunin skal m.a. byggjast á hagnýtum prófunum og óháðum vísindarannsóknum.

2. Ef nauðsynlegt er talið, í kjölfar gerleikamatsins sem um getur í 1. mgr., að aðlaga ákvæði liðar 3.2 í I. viðauka þannig að þau feli í sér sambland af óbeinum og virkum ráðstöfunum, sem veita a.m.k. sömu vernd og núverandi ákvæði liðar 3.2. í I. viðauka, skal framkvæmdastjórnin senda Evrópuþinginu og ráðinu tillögu um að breyta þessari tilskipun í samræmi við það.

3. Svo lengi sem aðlögun þessarar tilskipunar takmarkast við innleiðingu annarra óbeinna ráðstafana sem veita a.m.k. sömu vernd og núverandi ákvæði liðar 3.2. í I. viðauka má nefndin um aðlögun að tækniþróunum, í samræmi við málsmeðferðina sem mælt er fyrir um í 13. gr. tilskipunar 79/156/EEB, annast framkvæmd slíkrar aðlögunar.

4. Framkvæmdastjórnin skal senda Evrópuþinginu og ráðinu skýrslu um niðurstöður vöktunarinnar, sem um getur í 1. mgr., fyrir 1. apríl 2006 og á tveggja ára fresti eftir það.

6. gr.

Tilskipun 70/156/EEB er hér með breytt sem hér segir:

1. Eftirfarandi liðir bætist við í I. viðauka:

„9.23. Vernd gangandi vegfarenda

9.23.1. Leggja skal fram nákvæma lýsingu, þ.m.t. ljósmyndir og/eða teikningar, af ökutæki með tilliti til burðarvirkis, mála, viðeigandi viðmiðunarlína og smíðafna framhluta ökutækisins (að innan og utan). Í þessari lýsingu skulu koma fram upplýsingar um allan uppsettan, virkan varnarbúnað.“

2. Eftirfarandi liðir bætist við í A-hluta III. viðauka:

„9.23. Vernd gangandi vegfarenda

9.23.1. Leggja skal fram nákvæma lýsingu, þ.m.t. ljósmyndir og/eða teikningar, af ökutæki með tilliti til burðarvirkis, mála, viðeigandi viðmiðunarlína og smíðafna framhluta ökutækisins (að innan og utan). Í þessari lýsingu skulu koma fram upplýsingar um allan uppsettan, virkan varnarbúnað.“

3. Eftirfarandi 58. liður og neðanmálsgreinar bætast við í I. hluta IV. viðauka:

Viðfangsefni	Númer tilskipunar	Tilvísun í Stjórnartíðindi ESB	Gildissvið									
			M ₁	M ₂	M ₃	N ₁	N ₂	N ₃	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
„58 Vernd gangandi vegfarenda	2003/102/EB	Stjtið. ESB L 321, 6.12.2003, bls. 15.	X ⁽⁶⁾			X ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾						

⁽⁶⁾ með hámarks massa sem er ekki meiri en 2,5 tonn.

⁽⁷⁾ byggt á ökutækjum í flokki M₁.“

4. Texta XI. viðauka er breytt sem hér segir:

— eftirfarandi 58. liður bætist við í 1. viðbæti:

Liður	Viðfangsefni	Númer tilskipunar	M_1 $\leq 2\,500$ (¹) kg	M_1 $> 2\,500$ (¹) kg	M_2	M_3
„58	Vernd gangandi vegfarenda	2003/102/EB	X“			

— eftirfarandi 58. liður bætist við í 2. viðbæti:

Liður	Viðfangsefni	Númer tilskipunar	M_1	M_2	M_3	N_1	N_2	N_3	O_1	O_2	O_3	O_4
„58	Vernd gangandi vegfarenda	2003/102/EB“										

— eftirfarandi 58. liður bætist við í 3. viðbæti:

Liður	Viðfangsefni	Númer tilskipunar	M_2	M_3	N_1	N_2	N_3	O_1	O_2	O_3	O_4
„58	Vernd gangandi vegfarenda	2003/102/EB“									

7. gr.

1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 31. desember 2003. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.

Þau skulu beita þessum ráðstöfunum frá og með 1. janúar 2004.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessar ráðstafanir skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þær eru birtar opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

2. Aðildarríkin skulu senda framkvæmdastjórninni helstu ákvæði úr landslögum sem þau samþykkja um málefni sem tilskipun þessi nær til.

8. gr.

Reglugerð þessi öðlast gildi daginn eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

9. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 17. nóvember 2003.

Fyrir hönd Evrópuþingsins,

P. COX

forseti.

Fyrir hönd ráðsins,

G. ALEMANNO

forseti.

I. VIÐAUKI

TÆKNILEG ÁKVÆÐI

1. GILDISSVIÐ:

Tilskipunin gildir um yfirborð framhluta ökutækja. Í þessari tilskipun merkir ökutæki öll vélknúin ökutæki, eins og þau eru skilgreind í 2. gr. og II. viðauka við tilskipun 70/156/EBE, í flokki M₁ með hámarks massa, sem er ekki meiri en 2,5 tonn, og ökutæki í flokki N₁, sem eru byggð á ökutækjum í flokki M₁, með hámarks massa sem er ekki meiri en 2,5 tonn.

2. SKILGREININGAR

Í þessari tilskipun er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

- 2.1. „A-stoð“: fremsta og ysta þakstoðin sem nær frá undirvagni til þaks ökutækisins.
- 2.2. „Stuðari“: neðri hluti ytra burðarvirkis ökutækis að framan. Til hans teljast allir hlutar sem eru ætlaðir til að verja ökutæki þegar það lendir í árekstri að framan á litlum hraða við annað ökutæki og einnig allir hlutar sem eru festir við þennan hluta.
- 2.3. „Frambrún vélarhlífar“: efri hluti ytra burðarvirkis að framan, þ.m.t. vélarhlífin og brettin, svæðið ofan við og til hliðar við umgjörð aðalljóska og allir aðrir viðfestir hlutir.
- 2.4. „efra borð vélarhlífar“: ytri hluti yfirbyggingarinnar sem efra yfirborð allra ytri hluta teljast til, nema framrúðan, A-stoðirnar og allir hlutar sem eru fyrir aftan þær. Til þess teljast því m.a. vélarhlífin, brettin, loftinntakið, rúðupurruásinn og neðri hluti framrúðukarmsins.
- 2.5. „Álagsstuðull fyrir höfuð (Head Performance Criterion, HPC)“ er útreikningur á tilteknu tímabili á hámarkshröðuninni sem getur orðið við höggið.
- 2.6. „Framrúða“: rúða framan á ökutækinu sem uppfyllir allar viðeigandi kröfur í I. viðauka við tilskipun 77/649/EBE ⁽¹⁾.
- 2.7. „Gerð ökutækis“: flokkur vélknúinna ökutækja sem eru ekki frábrugðin hvert öðru fyrir framan A-stoðirnar að því er varðar eftirfarandi grundvallaratriði:

- burðarvirki,
- helstu mál,
- smíðafni ytri flata ökutækisins,
- fyrirkomulag íhluta (að utan eða innan),

að svo miklu leyti sem telja má að þau hafi neikvæð áhrif á niðurstöður þeirra höggprófana sem mælt er fyrir um í þessari tilskipun.

- 2.8. „Hámarksmassi“: tæknilega leyfilegur hámarksmassi með hleðslu sem framleiðandi gefur upp skv. lið 2.8 í I. viðauka við tilskipun 70/156/EBE.

3. ÁKVÆÐI UM PRÓFANIR

- 3.1. Þess er krafist að eftirfarandi prófanir séu framkvæmdar, þó er viðmiðunargildanna, sem tilgreind eru í liðum 3.1.3 og 3.1.4, einungis krafist vegna vöktunar.
- 3.1.1. Fötleggjarlíkan á móti stuðara: Þess er krafist að önnur af prófununum fyrir fötleggjarlíkanið, sem lýst er í liðum 3.1.1.1 eða 3.1.1.2, sé framkvæmd:
- 3.1.1.1. Neðri hluti fötleggjarlíkans á móti stuðara: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 40 km/klst.. Hámarks hreyfanlega hornið, sem hnéð beygist í, skal ekki vera stærra en 21°, hámarksskerfærsla hnés skal ekki vera meiri en 6,0 mm og hröðunin, sem er mæld við efri hluta sköflungsins, skal ekki vera meiri en 200 g.
- 3.1.1.2. Efri hluti fötleggjarlíkans á móti stuðara: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 40 km/klst. Augnablikssumma höggkraftanna með tilliti til tíma skal ekki vera stærri en 7,5 kN og beygjukraftvægið á höggprófunarbúnaðinn skal ekki vera stærra en 510 Nm.

⁽¹⁾ Tilskipun ráðsins 77/649/EBE frá 27. september 1977 um samræmingu laga aðildarríkjanna varðandi sjónsvið ökumanna vélknúinna ökutækja (Stjtið. EB L 267, 19. 10. 1977., bls. 1). Tilskipunin eins og henni var síðast breytt með tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 90/630/EBE (Stjtið. EB L 341, 6. 12. 1990, bls. 20).

- 3.1.2. Höfuðlíkan barns/smávaxins, fullorðins manns á móti efra borði vélarhlífar: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 35 km/klst. og nota skal 3,5 kg höggprófunarbúnað. Álagsstuðull fyrir höfuð skal ekki vera yfir 1000 fyrir 2/3 af prófunarfleti vélarhlífarinnar og 2000 fyrir hinn 1/3 hluta prófunarflatar vélarhlífarinnar.
- 3.1.3. Efri hluti fótleggjarlíkans á móti frambrún vélarhlífar: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraða sem er allt að 40 km/klst. Augnablikssumma höggkraftanna með tilliti til tíma skal ekki vera stærri en hugsanlegt markgildi, sem nemur 5,0 kN, og beygjukraftvægið á höggprófunarbúnaðinn skal skráð og borið saman við hugsanlegt markgildi sem nemur 300 Nm.
- 3.1.4. Höfuðlíkan fullorðins á móti framrúðu: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 35 km/klst. og nota skal 4,8 kg höggprófunarbúnað. Álagsstuðullinn fyrir höfuð skal skráður og borinn saman við hugsanlegt markgildi sem nemur 1000.
- 3.2. Þess er krafist að eftirfarandi prófanir séu framkvæmdar.
- 3.2.1. Fótleggjarlíkan á móti stuðara: Þess er krafist að önnur af prófununum fyrir fótleggjarlíkanið, sem lýst er í liðum 3.2.1.1 eða 3.2.1.2, sé framkvæmd:
- 3.2.1.1. Neðri hluti fótleggjarlíkans á móti stuðara: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 40 km/klst.. Hámarkshornið, sem hnéð beygist í, skal ekki vera stærra en 15,0°, hámarksskerfærsla hnés skal ekki vera meiri en 6,0 mm og hröðunin, sem er mæld við efri hluta sköflungsins, skal ekki vera meiri en 150 g.
- 3.2.1.2. Efri hluti prófunarfótleggjar á móti stuðara: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 40 km/klst. Augnablikssumma höggkraftanna með tilliti til tíma skal ekki vera stærri en 5,0 kN og beygjukraftvægið á höggprófunarbúnaðinn skal ekki vera stærra en 300 Nm.
- 3.2.2. Líkan af höfði barns á móti efra borði vélarhlífar: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 40 km/klst. og nota skal 2,5 kg höggprófunarbúnað. Álagsstuðull fyrir höfuð skal ekki vera yfir 1000 fyrir allan prófunarflöt vélarhlífarinnar.
- 3.2.3. Efri hluti fótleggjarlíkans á móti frambrún vélarhlífar: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraða sem er allt að 40 km/klst. Augnablikssumma höggkraftanna með tilliti til tíma skal ekki vera stærri en 5,0 kN og beygjukraftvægið á höggprófunarbúnaðinn skal ekki vera stærra en 300 Nm.
- 3.2.4. Höfuðlíkan fullorðins á efra borð vélarhlífar: Prófunin er framkvæmd með árekstrarhraðanum 40 km/klst. og nota skal 4,8 kg höggprófunarbúnað. Álagsstuðull fyrir höfuð skal ekki vera yfir 1000 fyrir allan prófunarflöt vélarhlífarinnar.
-

II. VIÐAUKI

STJÓRNSÝSLUÁKVÆÐI UM GERÐARVIÐURKENNINGU

1. UMSÓKN UM EB-GERÐARVIÐURKENNINGU
 - 1.1. Framleiðandi skal leggja fram umsókn um EB-gerðarviðurkenningu, skv. 4. mgr. 3. gr. tilskipunar 70/156/EBE, fyrir gerð ökutækis að því er varðar vernd gangandi vegfarenda.
 - 1.2. Fyrirmynd að upplýsingaskjalinu er að finna í 1. viðbæti.
 - 1.3. Líta ber tæknipjónustunni, sem annast prófanir vegna gerðarviðurkenningar, í té dæmigert ökutæki fyrir þá gerð sem viðurkenna á.
2. VEITING EB-GERÐARVIÐURKENNINGAR
 - 2.1. Ef prófanirnar, sem um getur í I. viðauka, eru gerðar í samræmi við forskriftirnar, sem er að finna í þeim viðauka og tækniforskriftirnar sem um getur í 3. gr. þessarar tilskipunar, skal veita EB-gerðarviðurkenningu skv. 1. mgr. 4. gr. og 3. mgr. 4. gr. í tilskipun 70/156/EBE.
 - 2.2. Fyrirmynd að EB-gerðarviðurkenningavottorði er að finna í 2. viðbæti.
 - 2.3. Allar viðurkenndar gerðir ökutækis skulu fá viðurkenningarnúmer í samræmi við ákvæði VII. viðauka við tilskipun 70/156/EBE. Aðildarríki skal ekki úthluta annarri gerð ökutækis sama númeri.
 - 2.4. Ef um vafa er að ræða skal, þegar sannprófað er hvort prófunaraðferðinni hafi verið fylgt, taka tillit til allra gagna eða prófunarniðurstaðna sem framleiðandi lætur í té og hægt er að taka tillit til við mat á viðurkenningarprófuninni sem viðurkenningaryfirvaldið framkvæmir.
3. BREYTINGAR Á GERÐ OG Á VIÐURKENNINGU
 - 3.1. Endurtaka ber prófunina ef gerðar eru breytingar á ökutækinu, er hafa áhrif á almennt smíðaform framhluta þess, sem að dómi yfirvaldsins hefðu merkjanleg áhrif á prófunarniðurstöður.
 - 3.2. Ákvæði 5. gr. tilskipunar 70/156/EBE gilda ef gerð ökutækis, sem er viðurkennd samkvæmt ákvæðum þessarar tilskipunar, er breytt.
4. SAMRÆMI FRAMLEIÐSLU
 - 4.1. Gera ber ráðstafanir til að tryggja samræmi framleiðslu í samræmi við ákvæðin sem mælt er fyrir um í 10. gr. tilskipunar 70/156/EBE.

1. viðbætur við II. viðauka

Upplýsingaskjal nr. ... í samræmi við I. viðauka við tilskipun ráðsins 70/156/EBE varðandi EB-gerðarviðurkenningu fyrir ökutæki að því er varðar vernd gangandi vegfarenda

Eftirfarandi upplýsingar skal, ef við á, gefa í þrítí og með efnisyfirliti. Teikningar, ef einhverjar eru, skulu vera í hæfilegum hlutföllum og nægilega nákvæmar, í stærðinni A4 eða brotnar saman í þá stærð. Ljósmyndir, ef einhverjar eru, skulu einnig vera nægilega nákvæmar.

Ef kerfi, íhlutir eða aðskildar tæknieiningar eru búnar rafeindastýringu skulu fylgja upplýsingar um hvernig hún vinnur.

0. ALMENNT

0.1. Tegund (viðskiptaheiti framleiðanda):

0.2. Gerð og almennt/almenn verslunarheiti):

0.3. Gerðarauðkenni ef slíkt er á ökutækinu:

0.3.1. Staðsetning auðkennisins:

0.4. Flokkur ökutækis:

0.5. Heiti og heimilisfang framleiðanda:

0.8. Heimilisfang samsetningarverksmiðju eða -verksmiðja:

1. ALMENNIR SMÍÐAEIGINLEIKAR ÖKUTÆKISINS

1.1. Ljósmyndir og/eða teikningar af dæmigerðu ökutæki:

1.6. Staðsetning og fyrirkomulag hreyfils:

9. YFIRBYGGING

9.1. Gerð yfirbyggingar:

9.2. Efni og smíðaaðferðir:

9.23. Vernd gangandi vegfarenda:

Leggja skal fram nákvæma lýsingu, þ.m.t. ljósmyndir og/eða teikningar, af ökutæki með tilliti til burðarvirkis, mála, viðeigandi viðmiðunarlína og smíðafna framhluta ökutækisins (að innan og utan). Í þessari lýsingu skulu koma fram upplýsingar um allan uppsettan, virkan búnað.

2. viðbætur við II. viðauka

FYRIRMYND

(hámarksstærð: A4 (210 × 297mm))

EB-GERÐARVIÐURKENNINGARVOTTORÐ

STIMPILL þess yfirvalds sem veitir
EB-gerðarviðurkenninguna

Tilkynning um:

- EB-gerðarviðurkenningu ⁽¹⁾
- rýmkun EB-gerðarviðurkenningar ⁽¹⁾
- synjun EB-gerðarviðurkenningar ⁽¹⁾

á gerð ökutækis/með hliðsjón af tilskipun/...../EB eins og henni var síðast breytt með tilskipun/...../EB

Gerðarviðurkenningarnúmer:

Ástæða fyrir rýmkun:

I. HLUTI

- 0.1. Tegund (viðskiptaheiti framleiðanda):
- 0.2. Gerð:
- 0.2.1. Verslunarheiti ef þær upplýsingar liggja fyrir:
- 0.3. Gerðarauðkenni ef slíkt er á ökutækinu:
- 0.3.1. Staðsetning auðkennisins:
- 0.4. Ökutækjaflokkur:
- 0.5. Heiti og heimilisfang framleiðanda:
- 0.8. Heiti og heimilisfang samsetningarverksmiðju eða -verksmiðja:

II. HLUTI

1. Frekari upplýsingar (þar sem við á) (sjá viðbót)
2. Tæknipjónusta sem annast prófanimar:
3. Dagsetning prófunarskýrslu:
4. Númer prófunarskýrslu:
5. Athugasemdir (ef einhverjar eru) (sjá viðbót)
6. Staður:
7. Dagsetning:
8. Undirskrift:
9. Meðfylgjandi er skrá yfir innihald upplýsingasafnsins sem viðurkenningaryfirvöld varðveita en það má fá afhent sé þess óskað.

⁽¹⁾ Stríkið yfir það sem á ekki við.

Viðbót við EB-gerðarviðurkenningarvottorð nr. vegna gerðarviðurkenningar ökutækis með tilliti til tilskipunar..... / /EB eins og henni var síðast breytt með tilskipun / /EB

1. **Frekari upplýsingar**

1.1. Stutt lýsing á ökutækisgerðinni með tilliti til burðarvirkis hennar, mála, lögunar og smíðaefta: ..

.....

1.2. Staðsetning hreyfils: fram í/aftur í/í miðju ⁽¹⁾

1.3. Drif: framhjóladrif/afturhjóladrif⁽¹⁾

1.4. Massi ökutækis sem látið er í té til prófunar:

á framási:

á afturási:

samtals:

1.5. Prófunarniðurstöður samkvæmt lið 3.1/3.2 í I. viðauka (strikið út eftir því sem við á):

1.5.1 Prófanir samkvæmt lið 3.1. í I. viðauka:

Prófun	Skráð gildi		Stenst prófun/stenst ekki prófun ⁽¹⁾
Neðri hluti prófunarfötleggjar á móti stuðara (ef prófun fer fram)	Beygjuhorn	gráður	
	Skerfærsla	mm	
	Hröðun við sköflung	g	
Efri hluti prófunarfötleggjar á móti frambrún vélarhlífar:	Summa höggkraftanna	kN	⁽²⁾
	Beygjukraftvægi	Nm	⁽²⁾
Efri hluti prófunarfötleggjar á móti stuðara (ef prófun fer fram)	Summa höggkraftanna	kN	
	Beygjukraftvægi	Nm	
Líkan af höfði barns/smávaxins fullorðins manns (3,5 kg) á efra borð vélarhlífar:	HPC-gildi á svæði A (a.m.k. 12 gildi)		
	HPC-gildi á svæði B (a.m.k. sex gildi)		
Höfuðlíkan fullorðins (4,8) á móti framrúðu:	HPC-gildi (a.m.k. fimm gildi)		⁽²⁾

⁽¹⁾ Í samræmi við gildin sem eru tilgreind í lið 3.1. í I. viðauka við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/102/EB frá 17. nóvember 2003 um vemd fótgangandi og annarra óvarinna vegfarenda gegn árekstri og við árekstur við vélknúð ökutæki.

⁽²⁾ Einungis vegna vöktunar.

⁽¹⁾ Strikið yfir það sem á ekki við.

1.5.2. Prófanir samkvæmt lið 3.2. í I. viðauka:

Prófun	Skráð gildi		Stenst prófun/stenst ekki prófun ⁽¹⁾
Neðri hluti prófunarfótleggjar á móti stuðara (ef prófun fer fram)	Beygjuhorn	gráður	
	Skerfærsla	mm	
	Hröðun við sköflung	g	
Efri hluti prófunarfótleggjar á móti frambrún vélarhlífar:	Summa höggkraftanna	kN	
	Beygjukraftvægi	Nm	
Efri hluti prófunarfótleggjar á móti stuðara (ef prófun fer fram)	Summa höggkraftanna	kN	
	Beygjukraftvægi	Nm	
Líkan af höfði barns (2,5 kg) á efra borð vélarhlífar:	HPC-gildi (a.m.k. níu gildi)		
Líkan af höfði fullorðins (4,8 kg) á efra borð vélarhlífar:	HPC-gildi (a.m.k. níu gildi)		

⁽¹⁾ í samræmi við gildin sem eru tilgreind í lið 3.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

1.6. Athugasemdir: (t.d.: gildir jafnt um ökutæki með stýri hægra og vinstra megin)

.....

ÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

2007/EES/54/04

frá 23. desember 2003

um tækniforskriftir fyrir framkvæmd 3. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2003/102/EB um vernd fótgangandi og annarra óvarinna vegfarenda í undanfara árekstrar og við árekstur við vélknúð ökutæki og um breytingu á tilskipun 70/156/EBE (*)

(tilkynnt með númeri C(2003) 5041)

(2004/90/EB)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA HEFUR,

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

1. gr.

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/102/EB um vernd fótgangandi og annarra óvarinna vegfarenda í undanfara árekstrar og við árekstur við vélknúð ökutæki og um breytingu á tilskipun ráðsins 70/156/EBE ⁽¹⁾, einkum 3. gr.,

Mælt er fyrir um tækniforskriftirnar sem nauðsynlegar eru til að framkvæma prófanir sem tilgreindar eru í liðum 3.1 og 3.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB í viðaukanum við þessa ákvörðun.

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

2. gr.

1) Í tilskipun 2003/102/EB eru settar fram prófanir og viðmiðunarmörk sem lúta að grunnkröfum um gerðarviðurkenningu Bandalagsins á vélknúnum ökutækjum með tilliti til verndar fótgangandi vegfarenda.

Ákvörðun þessi gildir frá 1. janúar 2004.

3. gr.

2) Til að tryggja að lögbær yfirvöld aðildarríkjanna beiti tilskipuninni á samræmdan hátt skal samkvæmt henni tilgreina þær tækniforskriftir sem nauðsynlegar eru til að framkvæma prófanirnar sem mælt er fyrir um í liðum 3.1 eða 3.2 í I. viðauka við þá tilskipun.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 23. desember 2003.

3) Prófanirnar eru byggðar á vísindavinnu Evrópunefndarinnar um aukið öryggi ökutækja, og tækniforskriftirnar til að framkvæmda þær skulu einnig byggðar á tilmælum nefndarinnar.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Erkki LIIKANEN

framkvæmdastjóri.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 31, 4.2.2004, bls. 21. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 162/2004 frá 3. desember 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 3.

⁽¹⁾ Stjtið. ESB L 321, 6.12.2003, bls. 15.

VIDAUKI

EFNISYFIRLIT

Bls.

I. HLUTI

1.	Almenn ákvæði	22
2.	Skilgreiningar	22

II. HLUTI

I. kafli	Almenn skilyrði sem gilda	32
II. kafli	Prófanir með prófunarfótlegg í stuðara	32
III. kafli	Prófanir með prófunarlærlegg í stuðara	37
IV. kafli	Prófanir með prófunarlærlegg í fremstu brún vélarhlífar	40
V. kafli	Prófanir með höfuðlíkani barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju í efra borð vélarhlífar	48
VI. kafli	Prófanir með höfuðlíkani fullorðinnar manneskju í framrúðu	51
VII. kafli	Prófanir með höfuðlíkani barns og fullorðinnar manneskju í efra borð vélarhlífar	54

I. VIÐBÆTIR

1.	Vottunarkröfur	59
2.	Höggbúnaður sem er prófunarfótleggur	59
3.	Höggbúnaður sem er prófunarlærleggur	60
4.	Höggbúnaður sem er höfuðlíkan	61

I. HLUTI

1. **Almenn ákvæði**

Þegar mælingar sem lýst er í þessum hluta eru gerðar á ökutæki skal ökutækið vera staðsett í venjulegri akstursstöðu eins og lýst er í lið 2.3. Ef á ökutækinu er merki, heillagripur eða annar hlutur sem myndi sveigjast aftur eða ganga til baka við lítið álag þá skal slíku álagi beitt fyrir og/eða á meðan þessar mælingar fara fram. Allir íhlutir ökutækis sem gætu skipt um lögun eða stöðu, s.s. aðalljós sem rísa upp, aðrir en fjöðrunaríhlutir eða virkur búnaður til verndar fótgangandi vegfarendum skulu hafa það lag eða settir í þá stöðu sem prófunarstofnanir í samráði við framleiðanda telja henta best meðan mælingarnar fara fram.

2. **Skilgreiningar**

Í þessari tilskipun er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

2.1. „gerð ökutækis“: flokkur ökutækja sem eru ekki frábrugðin, fyrir framan A-stoðirnar, með tilliti til eftirfarandi grundvallaratriða:

— burðarvirkis,

— helstu mála,

— smíðaeftirlit ytri flata ökutækisins,

— fyrirkomulag íhluta (að utan eða innan),

að svo miklu leyti sem þau hafa neikvæð áhrif á niðurstöður þeirra höggprófana sem mælt er fyrir um í II. hluta.

Með ökutækjum í flokki N1 sem byggð eru á ökutækjum í flokki M1 er vísað til þeirra ökutækja í flokki N1 sem hafa sömu byggingu og lögun fyrir framan A-stoðirnar og ökutæki sem fyrir eru í flokki M1.

- 2.2. „Helstu viðmiðunarmerki“ eru göt, yfirborðsfletir, merkingar og auðkenni á yfirbyggingu ökutækisins. Gerð viðmiðunarmerkis sem notað er og lóðrétt staða (Z-ás) hvers merkis miðað við jörðina skal tilgreind af framleiðanda ökutækisins í samræmi við akstursskilyrðin sem tilgreind eru í lið 2.3. Þessi merki skulu valin þannig að auðvelt sé að kanna aksturshæð og -stöðu ökutækisins að framan og aftan.

Ef helstu viðmiðunarmerki eru innan ± 25 mm frá þeirri stöðu á lóðréttu Z-ásnum sem tilgreind er í hönnuninni skal hönnunarstaðan talin venjuleg aksturshæð. Ef þetta skilyrði er uppfyllt skal ökutækið annað hvort lagað að hönnunarstöðunni eða allar frekari mælingar aðlagðar og prófanir gerðar þannig að líkt sé eftir því að ökutækið sé í hönnunarstöðunni.

- 2.3. „venjuleg akstursstaða“: staða ökutækisins tilbúið til aksturs, staðsett á jörðinni með hjólbarðana fyllta af lofti í þann loftþrýsting sem mælt er með og framhjólín vísa beint áfram, hámarksáfylling allra vökva sem eru nauðsynlegir til notkunar ökutækisins, með allan staðalbúnað frá framleiðanda ökutækisins, með 75 kg massa sem settur hefur verið á sæti ökumanns og 75 kg massa sem settur er í farþegasæti að framan og fjöðrunin stillt á aksturshraða sem nemur 40 km/klst. eða 35 km/klst. við venjuleg akstursskilyrði sem framleiðandinn tilgreinir (einkum fyrir ökutæki með virka fjöðrun eða sjálfvirkan hæðarstillingarbúnað),

- 2.4. „Lægsta viðmiðunarhæð“ er lárétta planið sem samsíða er jörðinni og markar hæð ökutækis, sem stendur á sléttu yfirborði með handbremsuna á og í venjulegri akstursstöðu, frá jörðu.

- 2.5. „Stuðari“: neðri hluti ytra burðarvirkis ökutækis að framan. Til hans teljast allir hlutir sem ætlaðir eru til að verja ökutæki þegar það lendir í árekstri að framan á litlum hraða við annað ökutæki og einnig allir hlutir sem eru festir við þennan hlut. Viðmiðunarhæð og ytri mörk stuðarans eru hornin og viðmiðunarlínur stuðarans eins og þær eru skilgreindar í liðum 2.5.1 til 2.5.5.

- 2.5.1. „Efri viðmiðunarlína stuðarans“: efri mörk mikilvægra punkta að því er varðar snertingu gangandi vegfarenda við stuðarann. Hún er skilgreind sem rúmfræðileg skurðlína á milli efstu snertipunkta beinnar brúnar sem er 700 mm að lengd og stuðarans þegar beinu brúninni er haldið samsíða lóðréttu lengdarplani ökutækisins, hallað aftur um 20° og hún færð eftir framhluta ökutækisins meðan hún snertir jörðina og yfirborð stuðarans (sjá mynd 1a).

Ef nauðsyn krefur skal stytta beinu brúnina til að koma í veg fyrir snertingu við hluti fyrir ofan stuðarann.

- 2.5.2. „Neðri viðmiðunarlína stuðarans“: neðri mörk mikilvægra punkta að því er varðar snertingu gangandi vegfarenda við stuðarann. Hún er skilgreind sem rúmfræðileg skurðlína á milli neðstu snertipunkta beinnar brúnar sem er 700 mm að lengd og stuðarans þegar beinu brúninni er haldið samsíða lóðréttu lengdarplani ökutækisins, hallað fram um 25° , og hún færð eftir framhluta ökutækisins meðan hún snertir jörðina og yfirborð stuðarans (sjá mynd 1b).

- 2.5.3. „Efri hæðarmörk stuðara“: lóðrétt fjarlægð frá jörðu í efri viðmiðunarlínu stuðarans, sem skilgreind er í lið 2.5.1 þar sem ökutækið er staðsett í venjulegri akstursstöðu.

- 2.5.4. „Neðri hæðarmörk stuðara“: lóðrétt fjarlægð frá jörðu í neðri viðmiðunarlínu stuðarans, sem skilgreind er í lið 2.5.2 þar sem ökutækið er staðsett í venjulegri akstursstöðu.

- 2.5.5. „Horn stuðara“: snertipunktur ökutækis við lóðrétt plan sem myndar 60° horn við lóðrétt lengdarplan ökutækisins og snertir ytra borð stuðarans (sjá mynd 2).

- 2.5.6. „Þriðjungur stuðarans“: rúmfræðileg skurðlína á milli „horna stuðarans“ eins og þau eru skilgreind í lið 2.5.5 mæld með sveigjanlegu bandi eftir útlínu stuðarans og skipt í þrjá jafnlanga hluta.
- 2.6. „Framskögun stuðara“ fyrir alla hluta ökutækis er lárétt fjarlægð milli efri viðmiðunarlínu stuðara eins og hún er skilgreind í lið 2.5.1 og viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífar eins og hún er skilgreind í lið 2.9.2.
- 2.7. „Efra borð að framan“ ytri hluti yfirbyggingarinnar sem efra borð allra ytri hluta telst til, nema framrúðan, A-stoðimar og allir hlutar sem eru fyrir aftan þær. Til þess telst því vélarhlífin, brettin, loftinntakið, rúðupurrkuásinn og neðri hluti framrúðukarmsins en það takmarkast þó ekki við þessa hluti.
- 2.8. „1000 mm ummálsfjarlægð“: rúmfræðileg skurðlína sem dregin er á efra borð að framan með öðrum enda sveigjanlegs bands sem er 1000 mm að lengd, þegar því er haldið í lóðréttu plani fyrir framan og aftan ökutækið og fært fram fyrir vélarhlíf og stuðara. Bandinu er haldið strekktu meðan á aðgerðinni stendur þar sem öðrum endanum er haldið í snertingu við jörðina, lóðrétt fyrir neðan framhlið stuðarans og hinum endanum haldið í snertingu við efra borð að framan (sjá mynd 3). Ökutækið er staðsett í venjulegri akstursstöðu.
- Samsvarandi aðferðum skal beitt og önnur bönd af hæfilegri lengd notuð til að mæla 1500 mm og 2000 mm ummálsfjarlægðir.
- 2.9. „Efra borð vélarhlífar“ er svæðið sem afmarkast af a-, b- og c-lið sem hér segir:
- a) viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífar, eins og hún er skilgreind í lið 2.9.2,
- b) hliðarviðmiðunarlínum vélarhlífar, eins og þær eru skilgreindar í lið 2.9.4,
- c) viðmiðunarlínu öftustu brúnar vélarhlífar, eins og hún er skilgreind í lið 2.9.7.
- 2.9.1. „Fremsta brún vélarhlífar“: efri hluti ytra burðarvirkis þ.m.t. vélarhlífin og bretti, efri- og hliðarhlutar umgjardar aðalljóska og allir aðrir hlutar sem eru festir við. Viðmiðunarlínan sem markar stöðu fremstu brúnar er skilgreind sem hæð hennar frá jörðu og lárétt fjarlægð hennar frá stuðara (framskögun stuðara) sem ákvarðað er í samræmi við liði 2.6, 2.9.2 og 2.9.3.
- 2.9.2. „Viðmiðunarlína fremstu brúnar vélarhlífar“ er skilgreind sem rúmfræðileg skurðlína snertipunktanna á milli beinnar brúnar sem er 1000 mm að lengd og yfirborðs vélarhlífarinnar að framan, þegar beinu brúninni er haldið samsíða lóðréttu lengdarplani ökutækisins, hallað aftur um 50° og lægri endinn er 600 mm fyrir ofan jörðu, og hún látin snerta fremstu brún vélarhlífarinnar og færð eftir henni (sjá mynd 4). Að því er varðar ökutæki þar sem yfirborð efra borðs vélarhlífarinnar hallar að jafnaði um 50°, þannig að beina brúnin er í stöðugri snertingu eða snertir á mörgum stöðum í stað þess að snerta í einum punkti, er viðmiðunarlínan ákvörðuð með beinu brúninni sem hallar aftur um 40° horn. Að því er varðar ökutæki sem eru þannig löguð að neðsti hluti beinu brúnarinnar snertir fyrst, þá telst sú snerting vera viðmiðunarlína fremstu brúnar vélarhlífarinnar í þeirri hliðarstöðu. Að því er varðar ökutæki sem eru þannig löguð að efsti hluti beinu brúnarinnar snertir fyrst, þá er rúmfræðileg skurðlína með ummálsfjarlægð sem nemur 1000 mm, eins og skilgreint er í lið 2.8 notuð sem viðmiðunarlína fremstu brúnar vélarhlífarinnar í þeirri hliðarstöðu.
- Einnig skal líta á efsta hluta stuðarans sem fremstu brún vélarhlífarinnar að því er þessa skuldbindingu varðar ef beina brúnin snertir hann þegar þessi aðferð er notuð.
- 2.9.3. „Hæð fremstu brúnar vélarhlífar“ fyrir alla hluta ökutækis er lóðrétt fjarlægð frá jörðu í viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífar sem skilgreind er í lið 2.9.2 þar sem ökutækið er staðsett í venjulegri akstursstöðu.
- 2.9.4. „Hliðarviðmiðunarlína vélarhlífar“ er skilgreind sem rúmfræðileg skurðlína á milli efstu snertipunkta beinnar brúnar sem er 700 mm að lengd og hliðar á vélarhlíf þegar beinu brúninni er haldið samsíða lóðréttu hliðarplani ökutækisins, hallað inn um 45° og hún látin snerta efra borð yfirbyggingarinnar að framan og færð eftir henni (sjá mynd 5).

- 2.9.5. „Hornviðmiðunarpunktur“: skurðpunktur viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífar og hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar (sjá mynd 6).
- 2.9.6. „Þriðjungur fremstu brúnar vélarhlífar“ er skilgreindur sem rúmfræðileg skurðlína á milli „hornviðmiðunarpunkta“ eins og þeir eru skilgreindir í lið 2.9.5 mæld með sveigjanlegu bandi eftir útlínu fremstu brúnar og skipt í þrjá jafnlanga hluta.
- 2.9.7. „Aftasta viðmiðunarlína vélarhlífar“ er skilgreind sem rúmfræðileg skurðlína á milli öftustu snertipunkta kúlu og efra borðs að framan eins og það er skilgreint í lið 2.7 þegar kúlan er færð eftir efra borðinu að framan en snertir áfram framrúðuna (sjá mynd 7). Þurrkublöð og armar eru fjarlægðir meðan þetta er gert. Fyrir prófanirnar sem lýst er í lið 3.1 í I. viðauka við tilskipunina skal þvermál kúlunnar vera 165 mm. Fyrir prófanirnar sem lýst er í lið 3.2 í I. viðauka við tilskipunina skal þvermál kúlunnar vera 165 mm ef neðri hluti framrúðukarmsins á miðlínu ökutækisins er staðsettur í ummálsfjarlægð, eins og hún er skilgreind í lið 2.8, sem er 1500 mm eða meira frá jörðu en þvermál kúlunnar skal vera 130 mm þegar þessi ummálsfjarlægð er minni en 1500 mm. Ef viðmiðunarlína öftustu brúnar vélarhlífar er staðsett í ummálsfjarlægð sem er meira en 2100 mm frá jörðu er viðmiðunarlína öftustu brúnar vélarhlífarinnar skilgreind með rúmfræðilegu skurðlínunni sem er í 2100 mm ummálsfjarlægð, eins og hún er skilgreind í lið 2.8. Þar sem aftasta viðmiðunarlína vélarhlífar og hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar skerast ekki er öftustu viðmiðunarlínu breytt í samræmi við aðferðina sem lýst er í lið 2.9.9.
- 2.9.8. „Þriðjungur efra borðs vélarhlífar“ er skilgreindur sem rúmfræðileg skurðlína á milli „hliðarviðmiðunarlína vélarhlífar“ eins og þær eru skilgreindar í lið 2.9.4 mæld með sveigjanlegu bandi eftir útlínu efra borðs vélarhlífar og skipt í þrjá jafnlanga hluta.
- 2.9.9. „Skurðpunktur öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífar og hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar“ þar sem aftasta viðmiðunarlína vélarhlífar og hliðarviðmiðunarlína vélarhlífar skerast ekki skal framlengja og/eða breyta öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar með hálfhringlaga máti sem hefur 100 mm geisla. Mátið skal vera úr þunnu, sveigjanlegu efni sem auðvelt er að sveigja í hvaða átt sem er þannig að það bognar. Æskilegt er að mátið tví- eða margbogni ekki þar sem það gæti hrukkast. Mælt er með því að notuð sé plastþynna, frauðklædd að aftan, sem gerir það að verkum að mátið rennur ekki til á yfirborði ökutækisins. Mátið skal merkt fjórum punktum frá „A“ til „D“ eins og sýnt er á mynd 8 meðan mátið liggur á sléttu yfirborði.

Mátið skal sett á ökutækið þannig að horn „A“ og „B“ séu samhliða hliðarviðmiðunarlínu. Tryggt skal að þessi tvö horn haldist samhliða hliðarviðmiðunarlínunni og mátið skal fært jafnt og þétt aftur þangað til boginn í mátinu snertir öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar. Meðan á ferlinu stendur skal mátið beygt þannig að það fylgi útlínu efra borðs vélarhlífar ökutækisins eins nákvæmlega og unnt er án þess að mátið krumpist eða brotni upp á það. Ef snerting á milli mátsins og öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar verður utan við bogann sem markast af punktum „C“ og „D“ skal framlengja og/eða breyta öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar svo hún fylgi ummálsboga mátsins og snerti hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífarinnar eins og sýnt er á mynd 9.

Ef mátið getur ekki snert hliðarviðmiðunarlínu á punktum „A“ og „B“ og öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífar samtímis, eða punkturinn þar sem aftasta viðmiðunarlína vélarhlífar og mátið snertast er á boganum sem punktar „C“ og „D“ marka, skal nota fleiri mál sem hvert hefur 20 mm stærri geisla en hið fyrra þangað til öll fyrrgreind skilyrði eru uppfyllt.

Þegar búið er að breyta skilgreiningu á öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífar er vísað til hennar í öllum síðari liðum og upphafleg endamörk línunnar eru ekki notuð.

- 2.10. „Álagsviðmið fyrir höfuð (HPC)“ er reiknað út frá hröðunarferlum sem hámark (sem veltur á t_1 og t_2) jöfnunnar:

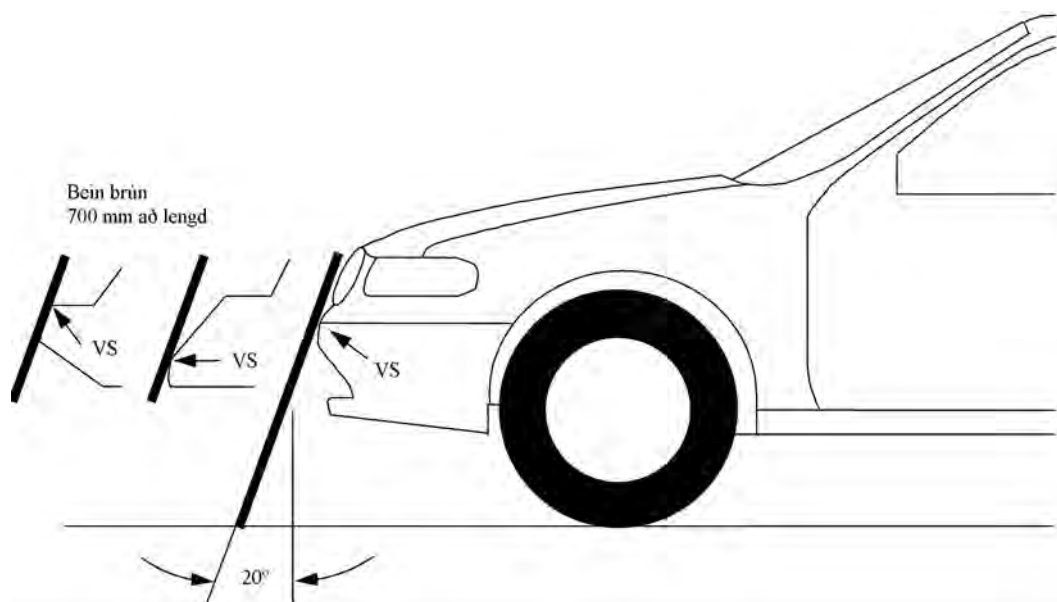
$$HPC = \left[\frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} a \, dt \right]^{2,5} (t_2 - t_1)$$

þar sem „a“ er hröðunin sem margfeldi af „g“ og t_1 og t_2 eru tímagildin (táknud í sekúndum) við höggvið og marka upphaf og enda mælingarinnar þar sem gildið fyrir álagsviðmiðið fyrir höfuð er hámarkið. Þegar hámarksgildið er reiknað skal sleppa gildum fyrir HPC ef tímabilið ($t_1 - t_2$) er lengra en 15 ms.

- 2.11. „Framrúða“: rúða framan á ökutækinu sem uppfyllir allar viðeigandi kröfur í I. viðauka við tilskipun ESB 77/649/EBE.
- 2.11.1 „Aftari viðmiðunarlína framrúðu“ er skilgreind sem rúmfræðileg skurðlína á milli fremstu snertipunkta kúlu og framrúðu eins og hún er skilgreind í lið 2.11 þegar kúla sem er 165 mm í þvermál er færð eftir efri hluta framrúðukarmsins, þ.m.t. listar, en snertir áfram framrúðuna (sjá mynd 10).

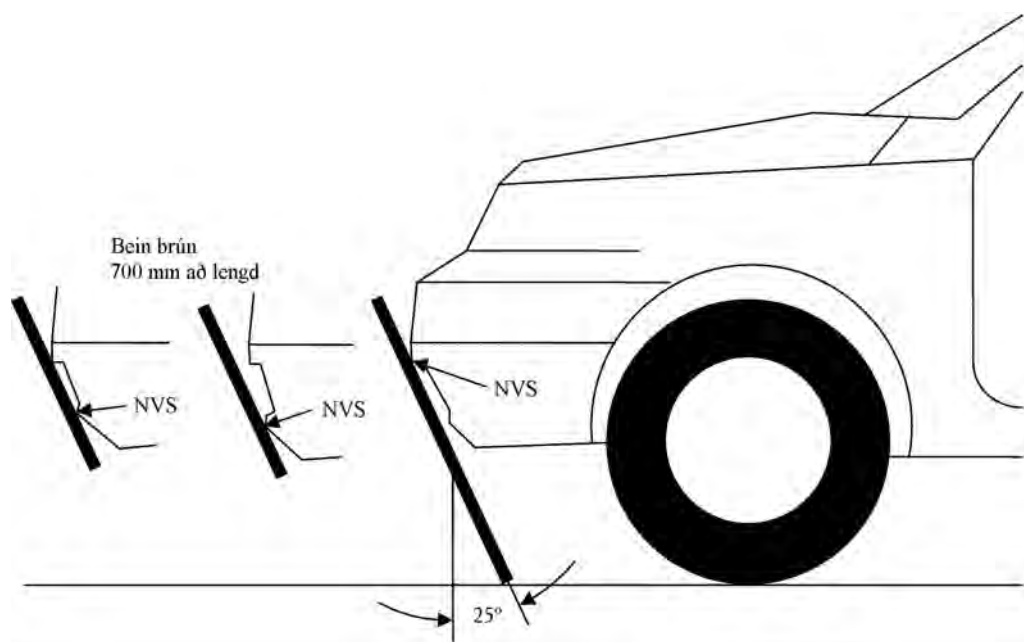
Mynd 1a

Ákvörðun efri viðmiðunarlínu stuðara



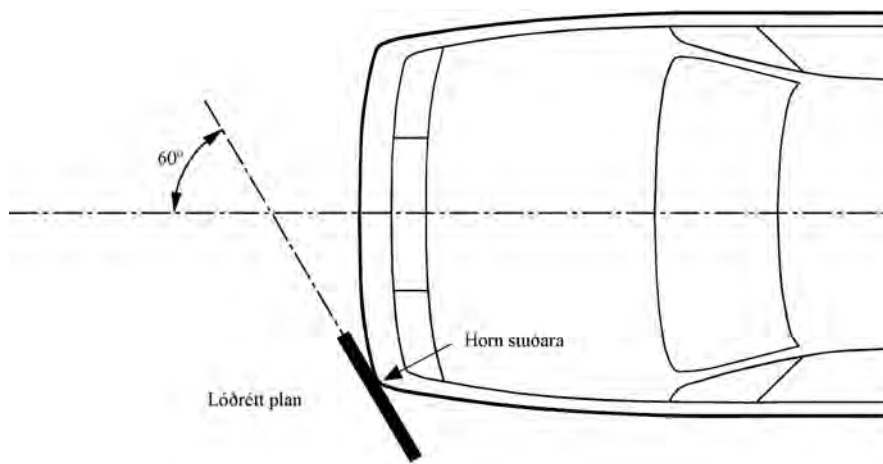
Mynd 1b

Ákvörðun neðri viðmiðunarlínu stuðara



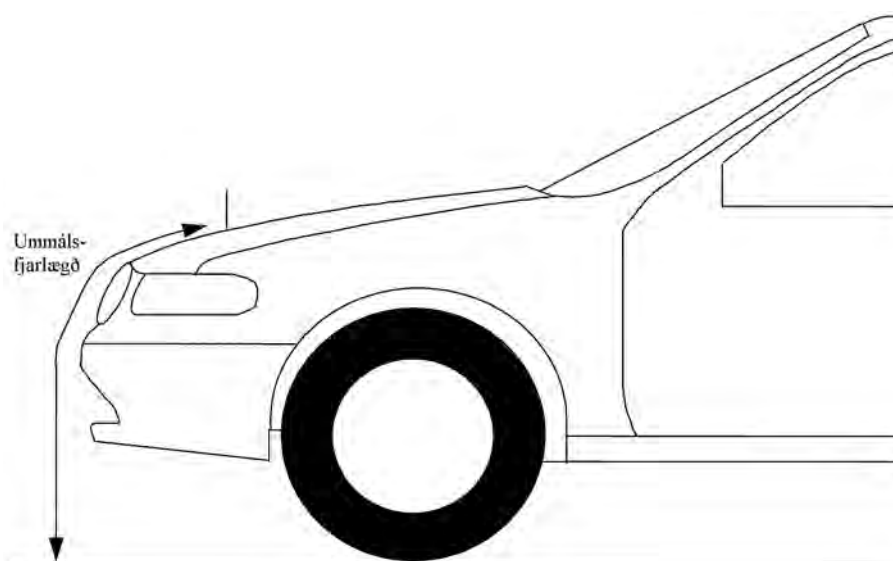
Mynd 2

Ákvörðun horns stuðara

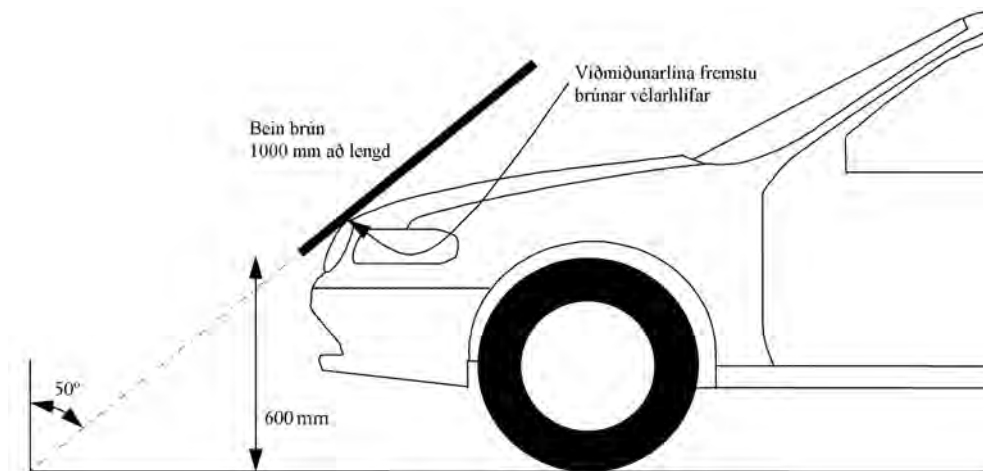


Mynd 3

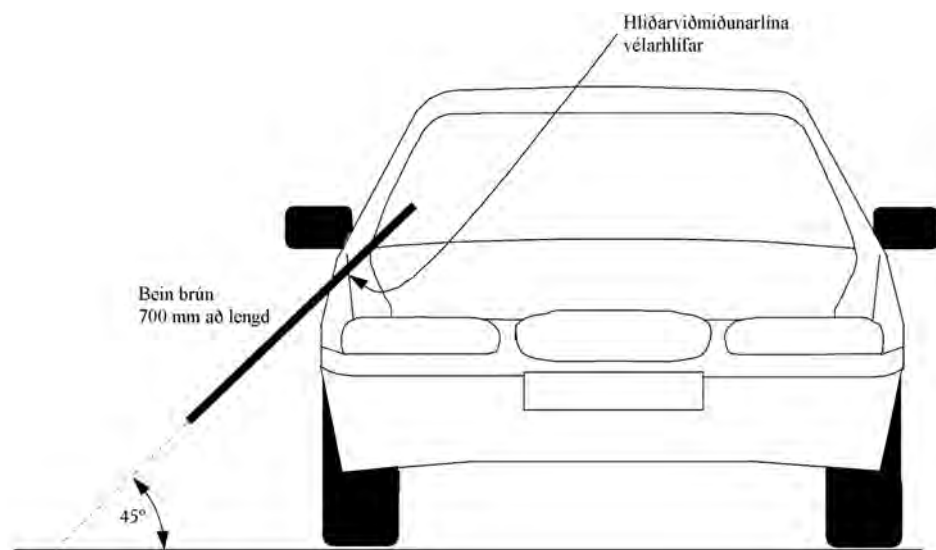
Ákvörðun ummálsfjarlægðar



Mynd 4

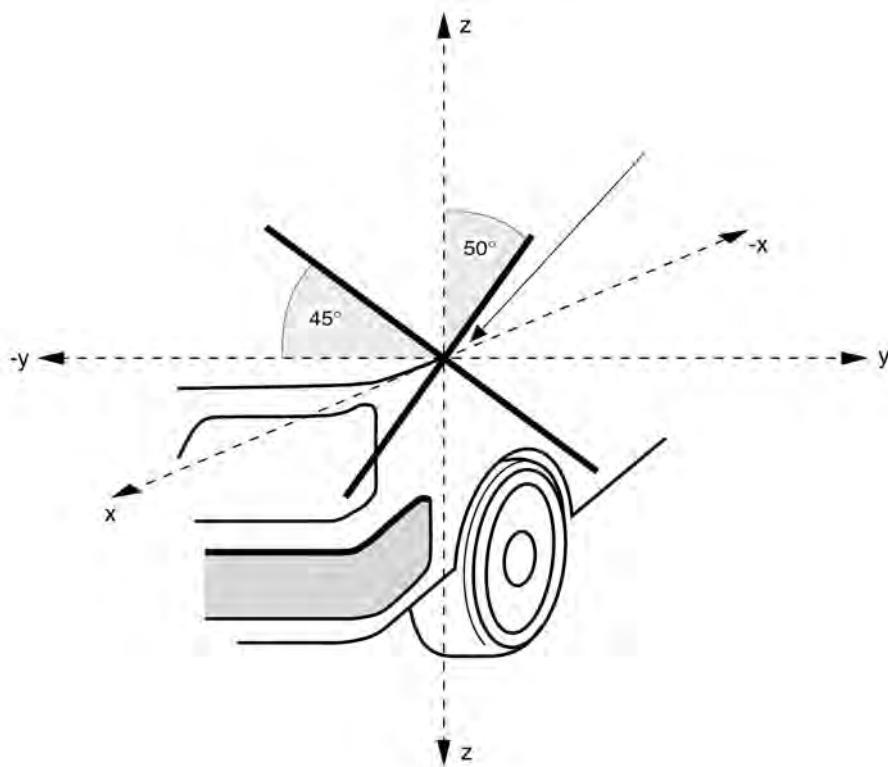
Ákvörðun viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífar

Mynd 5

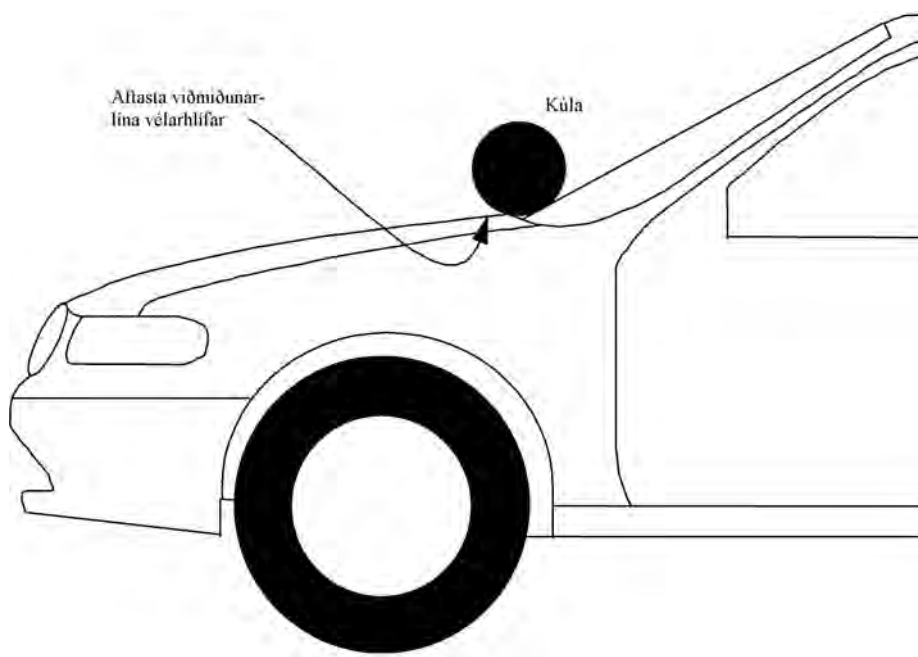
Ákvörðun hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar

Mynd 6

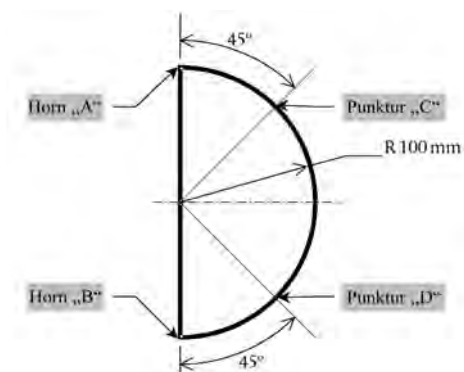
Ákvörðun hornviðmiðunarpunktar, sku“rðpunktar viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífar og hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar



Mynd 7

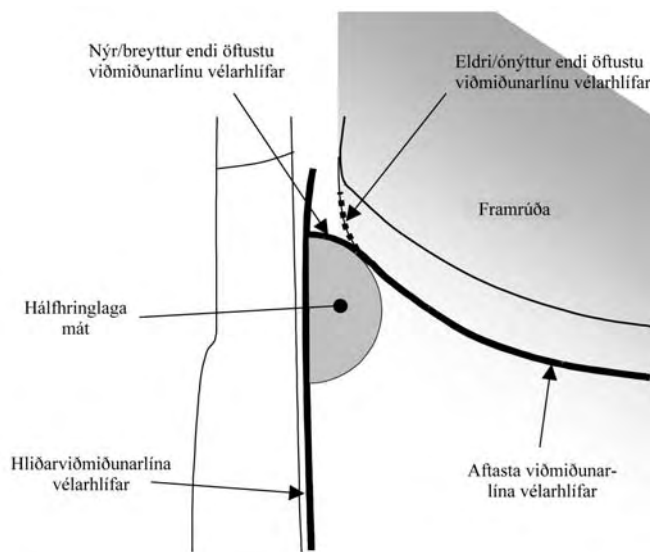
Ákvörðun öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífar

Mynd 8

Hönnun máts og merkinga sem notaðar eru til að tengja öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífar og hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar

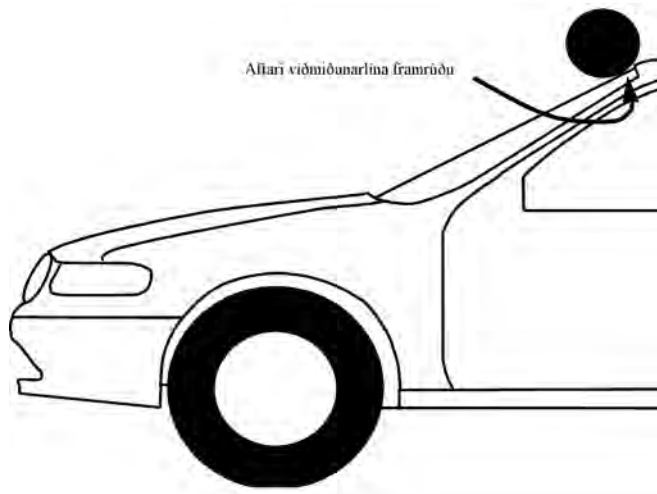
Mynd 9

Lóðsýn á aftara horn vélarhlífar þar sem aftasta viðmiðunarlína vélarhlífar er framlengd til að mæta hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífar á ummálsboga máts



Mynd 10

Ákvörðun aftari viðmiðunarlínu framrúðu



II. HLUTI

I. KAFLI

Almenn skilyrði sem gilda**1. Fullbúið ökutæki**

- 1.1. Prófanir á fullbúnum ökutækjum skulu uppfylla skilyrðin sem tilgreind eru í liðum 1.1.1, 1.1.2 og 1.1.3.
- 1.1.1. Ökutækið skal vera í venjulegri akstursstöðu og skal annað hvort tryggilega fest á upphækkaðar stoðir eða standa á sléttu yfirborði með handbremsuna á.
- 1.1.2. Allur búnaður sem hannaður er til að vernda óvarða vegfarendur skal virkjaður með réttum hætti áður en og/eða vera virkur meðan viðeigandi prófun er gerð. Það er á ábyrgð umsækjanda um viðurkenningu að sýna fram á að búnaðurinn muni virka eins og til er ætlast í árekstri við fótgangandi vegfaranda.
- 1.1.3. Allir íhlutir ökutækis sem gætu breytt um lögun eða stöðu, s.s. aðalljós sem rísa upp, aðrir en virkur búnaður til verndar fótgangandi vegfarendum skulu settir í þá stöðu eða hafa þá lögun sem prófunarstofnanir í samráði við framleiðanda telja henta best fyrir þessar prófanir.

2. Undirkerfi ökutækis

- 2.1. Þegar aðeins undirkerfi ökutækis er afhent til prófana skal það uppfylla skilyrðin sem tilgreind eru í liðum 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 og 2.1.4.
- 2.1.1. Allir hlutar burðarvirkis ökutækis og íhlutir undir vélarhlíf eða íhlutir sem eru fyrir innan framrúðu sem gætu komið við sögu í árekstri að framan við óvarinn vegfaranda skulu hafðir með í prófuninni til að sýna fram á hvernig öllum íhlutum sem hlut að eiga reiðir af og víxlverkun milli þeirra.
- 2.1.2. Undirkerfi ökutækis skal tryggilega fest í venjulegri akstursstöðu.
- 2.1.3. Allir búnaður sem hannaður er til að vernda óvarða vegfarendur skal virkjaður á réttan hátt áður en og/eða vera virkur meðan viðeigandi prófun er gerð. Það er á ábyrgð umsækjanda um viðurkenningu að sýna fram á að búnaðurinn muni virka eins og til er ætlast í árekstri við fótgangandi vegfaranda.
- 2.1.4. Allir íhlutir ökutækis sem gætu breytt um lögun eða stöðu, s.s. aðalljós sem rísa upp, aðrir en virkur búnaður til verndar fótgangandi vegfarendum skulu settir í þá stöðu eða hafa þá lögun sem prófunarstofnanir í samráði við framleiðanda telja henta best fyrir þessar prófanir.

II. KAFLI

Prófanir með prófunarfótlegg í stuðara**1. Gildissvið**

Þessi prófunaraðferð gildir um kröfurnar í bæði lið 3.1 og 3.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

2. Almenn ákvæði

- 2.1. Þegar höggbúnaður sem er prófunarfótleggur er prófaður í stuðara skal hann vera á „óknúnu flugi“ við höggið. Höggbúnaðinum skal sleppt á óknúið flug í nægilegri fjarlægð frá ökutækinu svo snerting höggbúnaðarins við knúningskerfið í afturkasti höggbúnaðarins hafi ekki áhrif á prófunarniðurstöðurnar.
- 2.2. Höggbúnaðinn má knýja af stað með loft-, fjaður- eða vökvaþrýstingi eða með öðrum aðferðum sem gefa sambærilega niðurstöðu.

3. Forskriftir prófunarinnar

- 3.1. Markmiðið með prófuninni er að tryggja að kröfurnar sem fram koma í liðum 3.1.1.1 og 3.2.1.1 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB séu uppfylltar.
- 3.2. Að minnsta kosti þrjár prófanir með prófunarfótlegg í stuðara skulu framkvæmdar, ein í miðju stuðarans og ein í hvorn ytri hluta stuðarans á stöðum sem taldir eru líklegastir til að valda meiðslum. Prófanirnar skulu gerðar á mismunandi hlutum stuðarans ef lögun hans er breytileg á svæðinu sem meta skal. Prófunarstaðirnir sem valdir eru skulu a.m.k. vera með 132 mm millibili og a.m.k. 66 mm frá skilgreindum hornum stuðarans. Þessar lágmarksfjarlægðir skulu mældar með sveigjanlegu bandi sem strekkt er eftir útlínun okutækisins. Gera skal grein fyrir þeim stöðum sem rannsóknarstofurnar velja í prófunarskýrslunni.
- 3.3. Framleiðendur geta sótt um undanþágu fyrir svæði ætlað dráttarkrök sem hægt er að fjarlægja.
- 3.4. *Prófunaraðferð*
- 3.4.1. Prófunarbúnaður
- 3.4.1.1. Höggbúnaður sem er prófunarfótleggur skal samanstanda af tveimur stífum, frauðklæddum hlutum sem gegna hlutverki lærleggs (efri hluti fótleggjar) og sköflungs (neðri hluti fótleggjar) og eru samtengdir með sveigjanlegri eftirlíkingu af hnjálið. Heildarlengd höggbúnaðarins skal vera 926 ± 5 mm, með tilskilinn prófunarmassa sem er $13,4 \pm 0,2$ kg og skal hann vera í samræmi við 4. lið þessa kafla og mynd 1 í þessum hluta. Festingar, vindur, o.s.frv. sem festar eru við höggbúnaðinn til að koma honum af stað kunna að vera stærri en málin sem gefin eru upp á mynd 1.
- 3.4.1.2. Nenum skal komið fyrir til að mæla hornið sem hnéð sveigist í og skerfærslu hnés. Einása hröðunarmæli skal komið fyrir á þeirri hlið sköflungsins sem verður ekki fyrir högginu, nálægt hnjáliðnum, og skal næmi ásinn snúa að höggstefnunni.
- 3.4.1.3. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 180 fyrir alla nema. Svörunargildin fyrir sveifluviddarflokkinn eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skulu vera 50° fyrir hornið sem hnéð beygist í, 10 mm fyrir skerfærsluna og 500 g fyrir hröðunina. Þetta merkir ekki að höggbúnaðurinn sjálfur verði að geta sveigst og færst sem nemur þessum hornum og færslum.
- 3.4.1.4. Höggbúnaðurinn skal uppfylla þær nothæfiskröfur sem tilgreindar eru í 2. lið í I. viðauka og skal útbúinn með sveigjanlegum hnjáliðum úr sömu framleiðslulotu og þeir sem notaðir eru í vottunarprófununum. Höggbúnaðurinn skal einnig klæddur með frauði sem skorið er af einni af allt að fjórum samliggjandi þynnum af ConforTM frauðholdi og eru úr sömu framleiðslulotu (skornar úr einum klump eða kúlu af frauði) að því tilskildu að frauðið úr einni af þessum þynnum hafi verið notað í hreyfivottunarprófuninni og að ekki muni meiru en $\pm 2\%$ á þyngd þessara þynna hverrar fyrir sig og þyngd þynnunnar sem notuð var í vottunarprófuninni. Vottaða höggbúnaðinn má að hámarki nota 20 sinnum áður en endurvottun er þörf. Í hverri prófun skal nota nýja hnjáliði sem bjagast á óafturkvæman hátt. Höggbúnaðinn skal einnig endurvotta ef meira en eitt ár er liðið frá síðustu vottun eða ef einhver nemi á höggbúnaðinum hefur gefið frá sér merki sem fór yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluviddarflokkinn.
- 3.4.1.5. Höggbúnaðurinn skal festur, knúinn af stað og honum sleppt eins og tilgreint er í liðum 2.1 og 2.2.
- 3.4.2. Framkvæmd prófunar
- 3.4.2.1. Ástand okutækisins eða undirkerfis þess skal vera í samræmi við kröfurnar í I. kafla þessa hluta. Stöðugt hitastig prófunarbúnaðarins og okutækisins eða undirkerfisins skal vera $20^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$.
- 3.4.2.2. Prófanir skulu gerðar milli horna á stuðaranum á staði sem tilgreindir eru í lið 3.2.
- 3.4.2.3. Stefna högghraðavígsins skal vera í lárétta plani og samsíða lóðréttu lengdarplaninu okutækisins. Frávik í stefnu hraðavígsins í lárétta planinu og lengdarplaninu skal vera $\pm 2^\circ$ við fyrstu snertingu.
- Ás höggbúnaðarins skal vera hornréttur á lárétta planið með $\pm 2^\circ$ frávik í hliðarplaninu og lengdarplaninu. Lárétta planið, lengdarplanið og hliðarplanið standa hornrétt hvert á annað (sjá mynd 3).

- 3.4.2.4. Neðsti hluti höggbúnaðarins skal vera í lægstu viðmiðunarhæð með ± 10 mm fráviki þegar fyrsta snerting verður við stuðarann (sjá mynd 2).

Þegar hæð knúningskerfisins er stillt skal gera ráð fyrir áhrifum þyngdaraflsins þann tíma sem höggbúnaðurinn er á óknúnu flugi.

Þegar fyrsta snerting verður skal staða höggbúnaðarins á lóðrétta ásnum vera þannig að hnjáliðurinn virki rétt með $\pm 5^\circ$ fráviki (sjá mynd 3).

- 3.4.2.5. Frávik miðlínu höggbúnaðarins við fyrstu snertingu skal vera innan ± 10 mm frá höggstaðnum sem valinn hefur verið.

- 3.4.2.6. Þegar höggbúnaðurinn og ökutækið snertast skal höggbúnaðurinn hvorki snerta jörðina né nokkurn þann hlut sem ekki tilheyrir ökutækinu.

- 3.4.2.7. Högghraði höggbúnaðarins þegar hann lendir á stuðaranum skal vera $11,1 \pm 0,2$ m/s. Taka skal tillit til áhrifa þyngdaraflsins þegar högghraðinn er fenginn úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.

4. Höggbúnaður sem er prófunarfótleggur

- 4.1. Þvermál lærleggsins og sköflungsins skal vera 70 ± 1 mm og skulu báðir klæddir „holdi“ og húð úr frauði. Frauðholdið skal vera 25 mm þykkt ConforTM frauð af gerð CF-45. Húðin skal vera úr neóprenfrauði með $\frac{1}{2}$ mm þykku nælonáklæði báðum megin og vera 6 mm þykk í heildina.

- 4.2. „Miðja hnés“ er skilgreind sem punkturinn sem hnéð sveigist um.

„Lærleggurinn“ er skilgreindur sem allir hlutar eða íhlutir (þ.m.t. hold, húðklæðning, höggdeyfir, tækjabúnaður og festingar, vindur o.s.frv. sem festir eru við höggbúnaðinn til að koma honum af stað) fyrir ofan miðju hnésins.

„Sköflungurinn“ er skilgreindur sem allir hlutar eða íhlutir (þ.m.t. hold, húðklæðning, tækjabúnaður og festingar, vindur o.s.frv. sem festir eru við höggbúnaðinn til að koma honum af stað) fyrir neðan miðju hnésins. Það skal tekið fram að skilgreiningin á sköflungnum tekur til frávika fyrir massa fótarsins o.s.frv.

- 4.3. Heildarmassi lærleggsins og sköflungsins skal vera annars vegar $8,6 \pm 0,1$ kg og hins vegar $4,8 \pm 0,1$ kg og heildarmassi höggbúnaðarins skal vera $13,4 \pm 0,2$ kg.

Þyngdarmiðja lærleggsins og sköflungsins skal vera annars vegar 217 ± 10 mm og hins vegar 233 ± 10 mm frá miðju hnésins.

Hverfitregða lærleggsins og sköflungsins um láréttan ás í gegnum þyngdarmiðju hvors um sig og hornrétt á höggstefnuna skal vera annars vegar $0,127 \pm 0,010$ kg/m² og hins vegar $0,120 \pm 0,010$ kg/m².

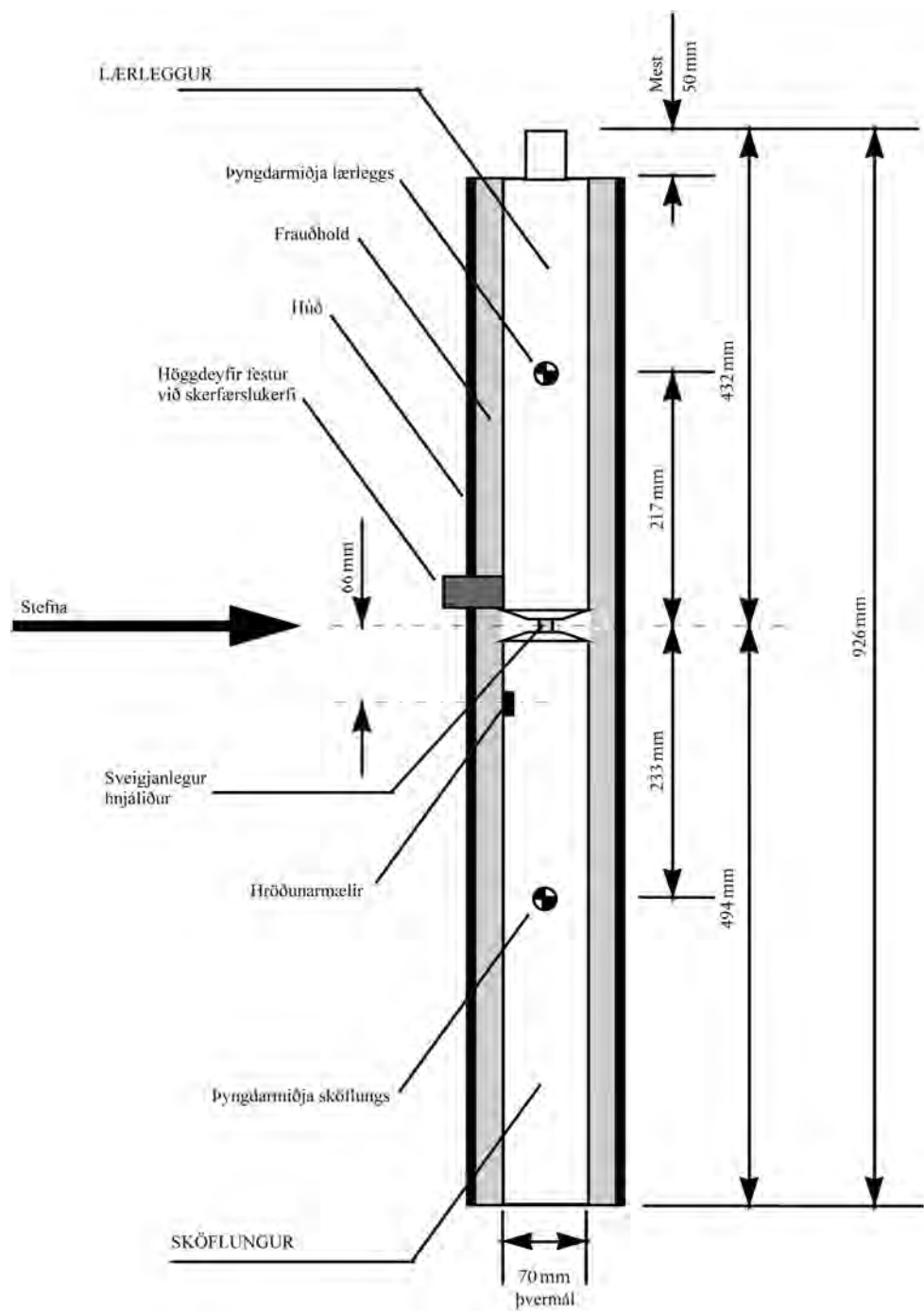
- 4.4. Einása hröðunarmæli skal komið fyrir á þeirri hlið sköflungsins sem verður ekki fyrir högginu, 66 ± 5 mm fyrir neðan hnjáliðinn, og skal næmi ásinns snúa að höggstefnunni.

- 4.5. Höggbúnaðurinn skal stilltur til að mæla hornið sem hnéð sveigist í og skerfærsluna milli lærleggsins og sköflungsins.

- 4.6. Höggdeyfi skal komið fyrir á skerfærslukerfinu og koma má honum fyrir hvar sem er á afturhlið höggbúnaðarins eða innan í honum. Höggdeyfirinn skal hafa þá eiginleika að höggbúnaðurinn standist kröfur um bæði kyrrstöðu- og hreyfiskerfærslu og komi í veg fyrir óhóflegan titring skerfærslukerfisins.

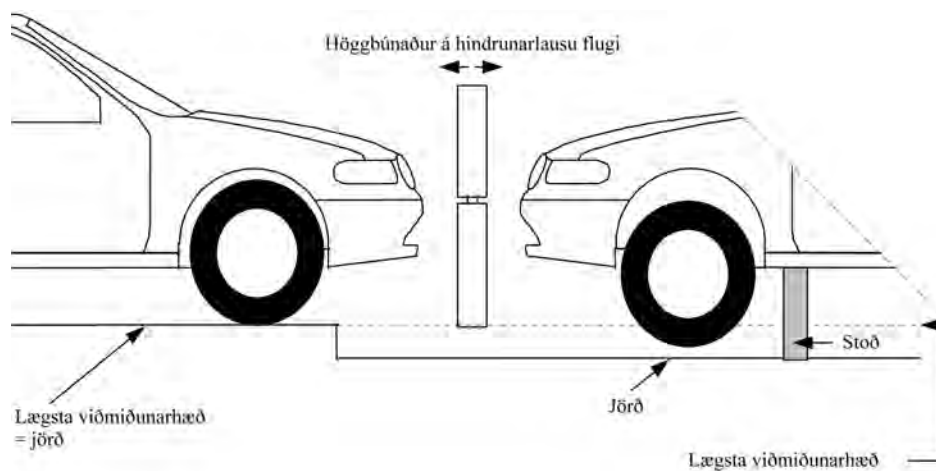
Mynd 1

Högbúnaður sem er prófunarfótleggur með húð- og frauðþekju



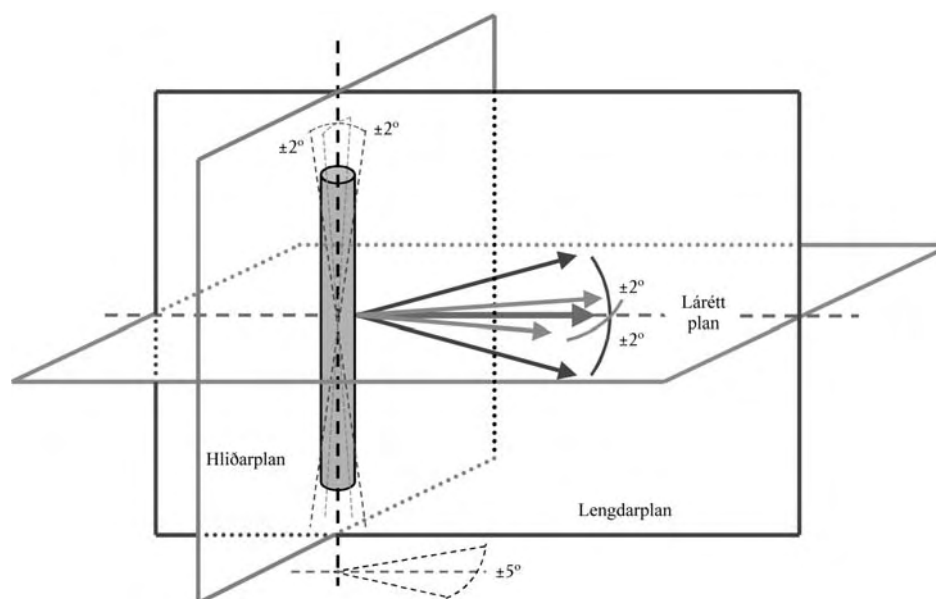
Mynd 2

Prófun með prófunarfótlegg í stuðara fullbúins ökutækis í venjulegri akstursstöðu (vinstra megin) og fullbúins ökutækis eða undirkerfis þess á upphækkuðum stöðum (hægra megin)



Mynd 3

Hallafrávik fyrir höggbúnað sem er prófunarfótleggur við fyrstu snertingu



III. KAFLI

Prófanir með prófunarlægg í stuðara**1. Gildissvið**

Þessi prófunaraðferð gildir um kröfurnar í bæði lið 3.1 og lið 3.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

2. Almenn ákvæði

2.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlæggur og notaður er í stuðarprófun skal festur við knúningskerfið með lið sem takmarkar snúningsátak til að koma í veg fyrir að álag sem lendir utan miðju skemmi stýrikerfið. Stýrikerfið skal útbúið með brautum með litla núningsmótstöðu sem eru ekki næmar fyrir álagi utan stefnu ássins og gera höggbúnaðinum kleift að ferðast eingöngu í tilgreinda höggstefnu þegar það snertir ökutækið. Brautirnar skulu hindra hreyfingu í aðrar áttir þ.m.t. snúning um einhvern ásanna.

2.2. Höggbúnaðinn má knýja af stað með loft-, fjaður- eða vökvaprýstingi eða með öðrum aðferðum sem gefa sambærilega niðurstöðu.

3. Forskriftir prófunarinnar

3.1. Markmiðið með prófuninni er að tryggja að kröfurnar sem fram koma í liðum 3.1.1.2 og 3.2.1.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB séu uppfylltar.

3.2. Prófun með prófunarlægg í stuðara skal framkvæmd á prófunarstaðina sem valdir eru í samræmi við lið 3.2 í II. kafla þessa hluta ef neðri hæð stuðara í prófunarstöðunni er hærri en 500 mm og framleiðandinn kys að framkvæma prófun með efri hluta prófunarfótleggjar frekar en með heilum prófunarfótlegg. Í undantekningartilvikum og einungis að því er varðar prófunaraðferðina sem beita ber samkvæmt lið 3.1.1.2 í I. viðauka við tilskipunina geta framleiðendur sótt um undanþágu að því er varðar beitingu þessarar prófunar á ökutæki þar sem neðri hæð stuðara er lægri en 500 mm.

3.3. Framleiðendur geta sótt um undanþágu fyrir svæði ætlað dráttarkrók sem hægt er að fjarlægja.

3.4. Prófunaraðferð**3.4.1. Prófunarbúnaður**

3.4.1.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlæggur skal vera stífur, klæddur frauði á þeirri hlið sem höggið fellur á, 350 ± 5 mm langur og vera í samræmi við 4. lið þessa kafla og mynd 4a í þessum hluta.

3.4.1.2. Tveimur álagsnemunum skal komið fyrir til að mæla í sitt hvoru lagi kraftana sem verka á hvorn enda höggbúnaðarins sem er prófunarlæggur auk þannema sem mæla beygjukraftvægi á miðjum höggbúnaðinum og í 50 mm fjarlægð frá miðlínunni hvoru megin (sjá mynd 4a).

3.4.1.3. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 180 fyrir alla nema. Svörunargildin fyrir sveifluvíddarflokkinn eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skulu vera 10 kN fyrir kraftnema og 1000 Nm fyrir mælingarnar á beygjukraftvæginu.

3.4.1.4. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlæggur skal uppfylla þær nothæfiskröfur sem tilgreindar eru í 3. lið í I. viðauka og skal klæddur frauði sem skorið er af sömu þynnu og efnið sem notað er í hreyfivottunarprófuninni. Vottaða höggbúnaðinn má að hámarki nota 20 sinnum áður en endurvottunar er þörf (þessi takmörkun gildir ekki um íhluti knúnings- eða stýrikerfisins). Höggbúnaðinn skal einnig endurvotta ef meira en eitt ár er liðið frá síðustu vottun eða ef einhver nemi á höggbúnaðinum hefur gefið frá sér merki sem fór yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluvíddarflokkinn.

- 3.4.1.5. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlærleggur skal festur, knúinn af stað og honum sleppt eins og tilgreint er í liðum 2.1 og 2.2.
- 3.4.2. Framkvæmd prófunar
- 3.4.2.1. Ástand ökutækisins eða undirkerfis þess skal vera í samræmi við kröfurnar í I. kafla þessa hluta. Stöðugt hitastig prófunarbúnaðarins og ökutækisins eða undirkerfisins skal vera $20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.
- 3.4.2.2. Prófanir skulu gerðar milli horna á stuðaranum á staði sem tilgreindir eru í lið 3.2.
- 3.4.2.3. Höggstefnan skal vera samsíða lengdarási ökutækisins og skal ás prófunarlærleggjarins vera lóðréttur þegar fyrsta snerting verður. Frávik fyrir þessar stefnur eru $\pm 2^\circ$. Þegar höggbúnaðurinn snertir fyrst skal miðlína hans vera mitt á milli efri viðmiðunarlínu stuðarans og neðri viðmiðunarlínu stuðarans með $\pm 10\text{ mm}$ frávik og á höggstaðnum sem valinn hefur verið með $\pm 10\text{ mm}$ frávik til hvorrar hliðar.
- 3.4.2.4. Högghraði höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur skal vera $11,1 \pm 0,2\text{ m/s}$ þegar hann lendir á stuðaranum.

4. Höggbúnaður sem er prófunarlærleggur

- 4.1. Heildarmassi höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur að meðtöldum þeim íhlutum knúnings- og stýrikerfisins sem eru áfastir höggbúnaðinum þegar höggið verður skal vera $9,5\text{ kg} \pm 0,1\text{ kg}$. Breyta má massa höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur frá þessu gildi um allt að $\pm 1\text{ kg}$ að því gefnu að nauðsynlegum högghraða sé einnig breytt með formúlunni:

$$V = \sqrt{\frac{1\,170}{M}}$$

þar sem

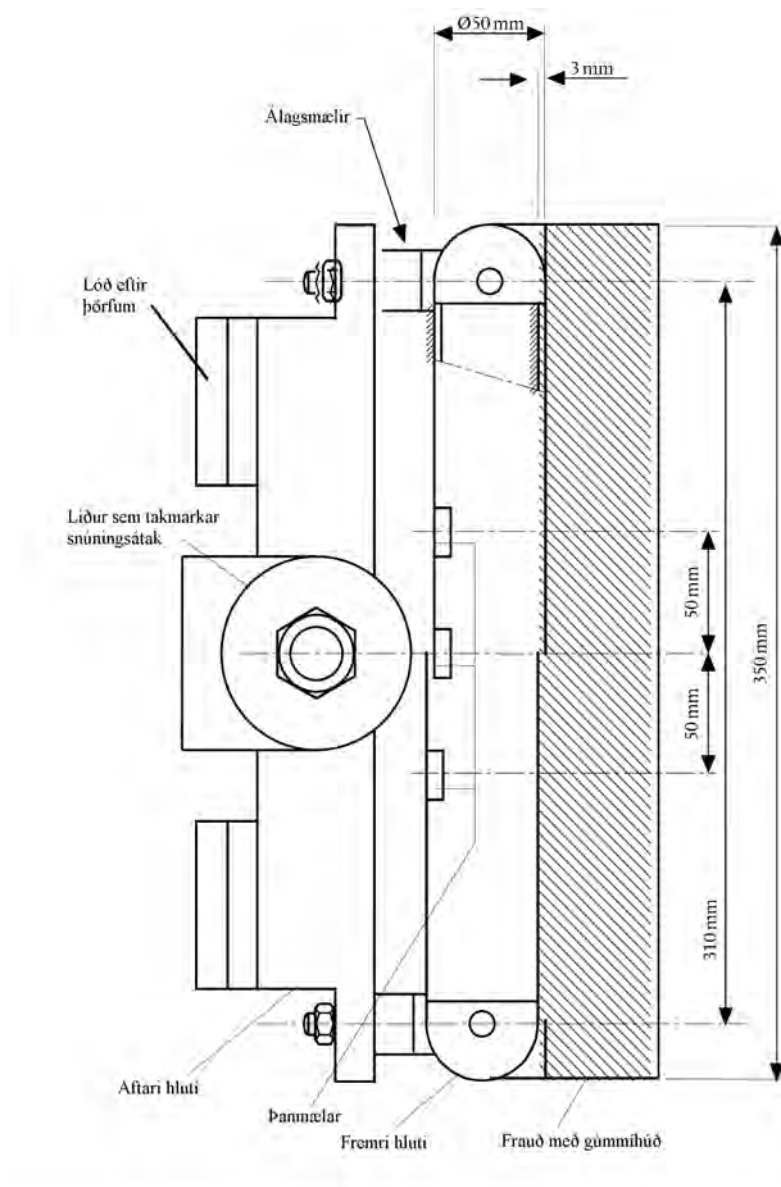
V = högghraði (m/s)

M = massi (kg) mældur með meira en $\pm 1\%$ nákvæmi

- 4.2. Heildarmassi fremri hluta og annarra íhluta framan við álagsnemasamstæðurnar ásamt þeim hlutum álagsnemasamstæðanna sem eru framan við virku hlutana, en að undanskildu frauði og húð, skal vera $1,95 \pm 0,05\text{ kg}$.
- 4.3. Frauðið skal vera tvær 25 mm þykkar þynnur af ConforTM frauði af gerð CF-45. Húðin skal vera 1,5 mm þykk trefjastyrkt gúmmíþynna. Frauðið og gúmmíhúðin skulu saman vega $0,6 \pm 0,1\text{ kg}$ (þetta tekur ekki til styrkinga, festinga, o.s.frv. sem eru notaðar til að festa aftari brúnir gúmmíhúðarinnar við aftari hlutann). Frauðið og gúmmíhúðin skulu sveigð aftur fyrir og gúmmíhúðin fest við aftari hlutann með bilstykki svo hliðar gúmmíhúðarinnar séu samsíða. Stærð og lögun frauðsins skal vera þannig að nægilegt bil sé á milli frauðsins og íhlutanna sem eru fyrir aftan fremri hlutann til að koma í veg fyrir að álag leiði milli frauðsins og þessara íhluta.
- 4.4. Þannemar, sem hver notar sérstaka rás, skulu notaðir á fremri hlutann til að mæla beygjukraftvægi á þremur stöðum eins og sýnt er á mynd 4a. Þannemarnir skulu staðsettir aftan á fremri hluta höggbúnaðarins. Ytri þannemarnir tveir skulu staðsettir $50 \pm 1\text{ mm}$ frá samhverfa ás höggbúnaðarins. Þanneminn í miðjunni er staðsettur á samhverfa ásnum með $\pm 1\text{ mm}$ frávik.
- 4.5. Liðnum sem takmarkar snúningsátakið skal komið þannig fyrir að lengdarás fremri hlutans standi hornrétt á ás stýrikerfisins með $\pm 2^\circ$ frávik og núningsvægi liðarins stillt á 650 Nm að lágmarki.

- 4.6. Þyngdarmiðja þeirra hluta höggbúnaðarins sem eru framan við liðinn sem takmarkar snúningsátakið, þ.m.t. öll áfest lóð, skal vera á miðlínu langsníðs höggbúnaðarins með 10 mm frávik.
- 4.7. Lengdin á milli miðlína álagsnemanna skal vera 310 ± 1 mm og þvermál fremri hlutans skal vera 50 ± 1 mm.

Mynd 4a

Höggbúnaður sem er prófunarlærleggur

IV. KAFLI

Prófanir með prófunarlægg í fremstu brún vélarhlífar**1. Gildissvið**

Þessi prófunaraðferð gildir um kröfurnar bæði í lið 3.1 og lið 3.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

2. Almenn ákvæði

2.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlæggur og notaður er í prófun í fremstu brún vélarhlífar skal festur við knúningskerfið með lið sem takmarkar snúningsáttak til að koma í veg fyrir að álag sem lendir utan miðju skemmi stýrikerfið. Stýrikerfið skal útbúið með brautum með litla snúningsmótstöðu sem eru ekki næmar fyrir álagi utan stefnu ássins og gera höggbúnaðinum kleift að ferðast eingöngu í tilgreinda höggstefnu þegar það snertir ökutækið. Brautirnar skulu hindra hreyfingu í aðrar áttir þ.m.t. snúning um einhvern ásanna.

2.2. Höggbúnaðinn má knýja af stað með loft-, fjaður- eða vökvaprýstingi eða með öðrum aðferðum sem gefa sambærilega niðurstöðu.

3. Forskriftir prófunarinnar

3.1. Markmiðið með prófuninni er að tryggja að kröfurnar sem fram koma í liðum 3.1.3 og 3.2.3 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB séu uppfylltar.

3.2. Að minnsta kosti þrjár prófanir með prófunarlægg í fremstu brún vélarhlífar skulu framkvæmdar, ein í miðju brúnar vélarhlífarinnar og ein í hvorn ytri hluta brúna vélarhlífarinnar á stöðum sem taldir eru líklegastir til að valda meiðslum. Prófunarstaður á hverjum þriðjungi skal þó valinn þannig að hreyfiorkan sem nauðsynleg er í högginu, og er skilgreind í lið 3.4.2.7, sé meiri en 200 J ef slíkur staður er fyrir hendi. Prófanirnar skulu gerðar á mismunandi hlutum stuðarans ef lögun hans er breytileg á svæðinu sem meta skal. Prófunarstaðirnir sem valdir eru skulu a.m.k. vera með 150 mm millibili og a.m.k. 75 mm frá skilgreindum hornviðmiðunarpunktum. Þessar lágmarksfjarlægðir skulu mældar með sveigjanlegu bandi sem strekkt er eftir útlínunum ökutækisins. Gera skal grein fyrir þeim stöðum sem rannsóknarstofurnar velja í prófunarskýrslunni.

3.3. Allur staðalbúnaður sem festur er á framenda ökutækisins skal vera á sínum stað.

3.4. Prófunaraðferð**3.4.1. Prófunarbúnaður**

3.4.1.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlæggur skal vera stífur, klæddur frauði á þeirri hlið sem höggið fellur á, 350 ± 5 mm langur og vera í samræmi við 4. lið þessa kafla og mynd 4b í þessum hluta.

3.4.1.2. Massi höggbúnaðarins sem er prófunarlæggur veltur á lögun framhluta ökutækisins og er ákvarðaður eins og tilgreint er í lið 3.4.2.7.

3.4.1.3. Tveimur álagsnemunum skal komið fyrir til að mæla í sitt hvoru lagi kraftana sem verka á hvorn enda höggbúnaðarins sem er prófunarlæggur auk þannema sem mæla beygjukraftvægi á miðjum höggbúnaðinum og í 50 mm fjarlægð frá miðlínunni hvorum megin (sjá mynd 4b).

3.4.1.4. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 180 fyrir alla nema. Svörunargildin fyrir sveifluviðdarflokkinn eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skulu vera 10 kN fyrir kraftnema og 1000 Nm fyrir mælingarnar á beygjukraftvæginu.

3.4.1.5. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlæggur skal uppfylla þær nothæfiskröfur sem tilgreindar eru í 3. lið í I. viðauka og skal klæddur frauði sem skorið er af sömu þynnu og efnið sem notað er í hreyfivottunarprófuninni. Vottaða höggbúnaðinn má að hámarki nota 20 sinnum áður en endurvottunar er þörf (þessi takmörkun gildir ekki um íhluti knúnings- eða stýrikerfisins). Höggbúnaðinn skal einnig endurvotta ef meira en eitt ár er liðið frá síðustu vottun eða ef einhver nemi á höggbúnaðinum hefur gefið frá sér merki sem fór yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluviðdarflokkinn.

- 3.4.1.6. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlærleggur skal festur, knúinn af stað og honum sleppt eins og tilgreint er í liðum 2.1 og 2.2.
- 3.4.2. Framkvæmd prófunar
- 3.4.2.1. Ástand ökutækisins eða undirkerfis þess skal vera í samræmi við kröfurnar í I. kafla þessa hluta. Stöðugt hitastig prófunarbúnaðarins og ökutækisins eða undirkerfisins skal vera $20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.
- 3.4.2.2. Prófanir skulu gerðar á fremstu brún vélarhlífarinnar á milli „hornviðmiðunarpunkta“ á staði sem tilgreindir eru í lið 3.2.
- 3.4.2.3. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlærleggur skal snúa þannig að miðlína knúningskerfisins og lengdarás höggbúnaðarins sem skellur á vélarhlífinni sé í lóðréttu plani fyrir framan og aftan þann hluta ökutækisins sem prófa skal. Frávik fyrir þessar stefnur eru $\pm 2^\circ$. Þegar höggbúnaðurinn snertir fyrst skal miðlína hans vera á viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífarinnar með $\pm 10\text{ mm}$ frávik (sjá mynd 5) og hliðarstaða hans vera á höggstaðnum sem valinn hefur verið með $\pm 10\text{ mm}$ frávik.
- 3.4.2.4. Nauðsynlegur höggghraði, höggstefna og massi höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur skulu ákvörðuð eins og tilgreint er í liðum 3.4.2.6 og 3.4.2.7. Frávik fyrir höggghraðann eru $\pm 2\%$ og frávik fyrir höggstefnuna eru $\pm 2^\circ$. Taka skal tillit til áhrifa þyngdarafsisins þegar höggghraðinn er fenginn úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður. Massi höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur skal mældur með meira en $\pm 1\%$ nákvæmni og ef melda gildið er annað en gildið sem krafist er skal breyta hraðanum sem krafist er til að bæta fyrir það eins og tilgreint er í lið 3.4.2.7.
- 3.4.2.5. Ákvörðun á lögun ökutækis:
- 3.4.2.5.1. Staða efri viðmiðunarlínu stuðarans skal ákvörðuð eins og tilgreint er lið 2.5.1 í I. hluta.
- 3.4.2.5.2. Viðmiðunarlína fremstu brúnar vélarhlífarinnar skal ákvörðuð eins og tilgreint er lið 2.9.2 í I. hluta.
- 3.4.2.5.3. Ákvarða skal hæð fremstu brúnar vélarhlífarinnar og framsköggun stuðarans fyrir þann hluta fremstu brúnar vélarhlífarinnar sem prófa skal eins og tilgreint er í liðum 2.9.3 og 2.6 í I. hluta.
- 3.4.2.6. Ákvarða skal nauðsynlegan höggghraða og höggstefnu út frá myndum 6 og 7 með tilliti til gildanna fyrir hæð fremstu brúnar vélarhlífarinnar og framsköggun stuðarans sem ákvarðað var skv. lið 3.4.2.5.
- 3.4.2.7. Heildarmassi höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur tekur til þeirra hluta knúnings- og stýrikerfisins sem eru áfastir höggbúnaðinum þegar höggið verður að meðtöldum áfestum lóðum.

Gildi massa höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur skal reiknað á eftirfarandi hátt:

$$M = 2E / V^2$$

þar sem

M = massi [kg]

E = höggorka [J]

V = hraði [m/s].

Nauðsynlegur hraði skal vera gildið sem fengið er í lið 3.4.2.6 og orkan skal fengin út frá mynd 8 með tilliti til gildanna fyrir hæð fremstu brúnar vélarhlífarinnar og framsköggun stuðarans sem ákvörðuð voru skv. lið 3.4.2.5.

Breyta má massa höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur frá þessu gildi um allt að $\pm 10\%$ að því gefnu að nauðsynlegum höggghraða sé einnig breytt með formúlunni hér á undan til að varðveita hreyfiorku höggbúnaðarins.

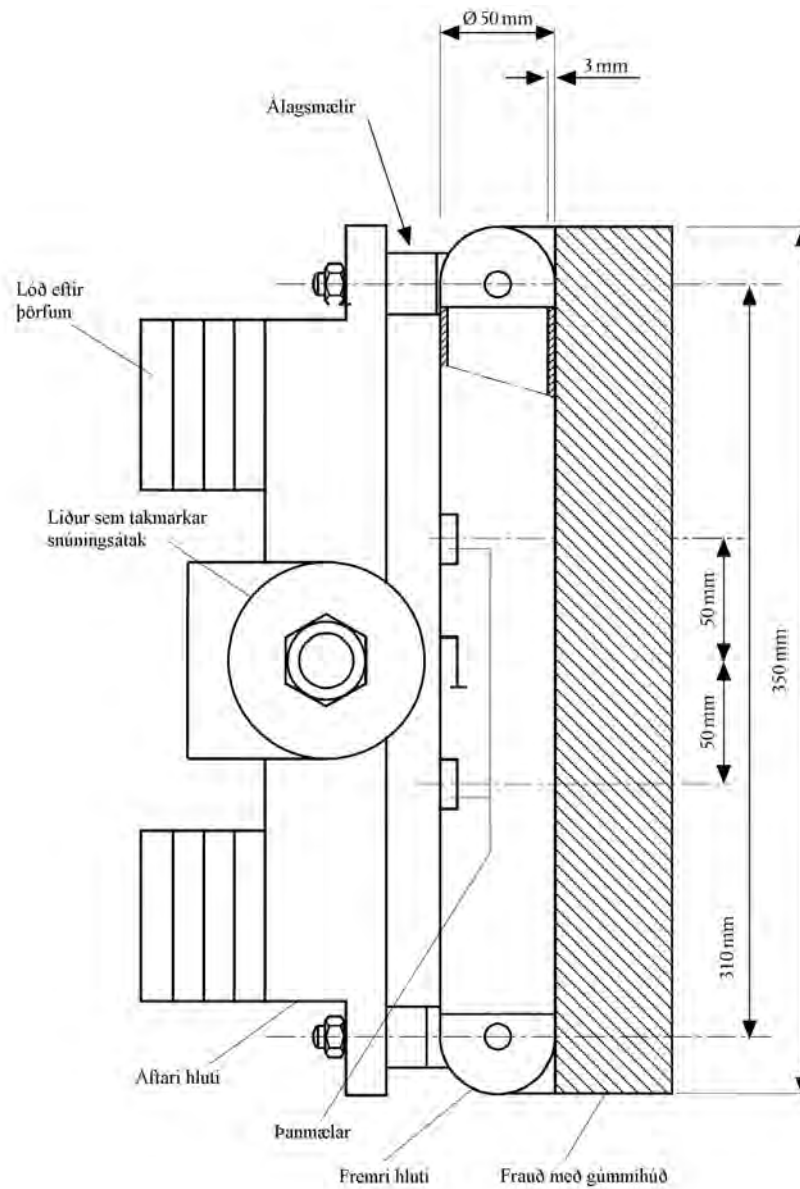
- 3.4.2.8. Þau viðbótarlód sem þarf til að massi höggbúnaðarins sem er prófunarlærleggur nái reiknaða gildinu sem ákvarðað er skv. lið 3.4.2.7 skulu fest aftan á aftari hlutann eins og sýnt er á mynd 4b eða á þá hluta stýrikerfisins sem eru áfastir höggbúnaðinum þegar höggið verður.

4. **Höggbúnaður sem er prófunarlærleggur**

- 4.1. Heildarmassi fremri hluta og annarra íhluta framan við álagsnemasamstæðurnar ásamt þeim hlutum álagsmælasamstæðanna sem eru framan við virku hlutana, en að undanskildu frauði og húð, skal vera $1,95 \pm 0,05$ kg.
- 4.2. Frauðið skal vera tvær 25 mm þykkar þynnur af Confor™ frauði af gerð CF-45. Húðin skal vera 1,5 mm þykk trefjastyrkt gúmmíþynna. Frauðið og gúmmíhúðin skulu saman vega $0,6 \pm 0,1$ kg (þetta tekur ekki til styrkinga, festinga, o.s.frv. sem eru notaðar til að festa aftari brúnir gúmmíhúðarinnar við aftari hlutann). Frauðið og gúmmíhúðin skulu sveigð aftur fyrir og gúmmíhúðin fest við aftari hlutann með bilstykki svo hliðar gúmmíhúðarinnar séu samsíða. Stærð og lögun frauðsins skal vera þannig að nægilegt bil sé á milli frauðsins og íhlutanna sem eru fyrir aftan fremri hlutann til að koma í veg fyrir að álag leiði milli frauðsins og þessara íhluta.
- 4.3. Þannemar, sem hver notar sérstaka rás, skulu notaðir á fremri hlutann til að mæla beygjukraftvægi á þremur stöðum eins og sýnt er á mynd 4b. Þannemarnir skulu staðsettir aftan á fremri hluta höggbúnaðarins. Ytri þannemarnir tveir skulu staðsettir 50 ± 1 mm frá samhverfa ás höggbúnaðarins. Þanneminn í miðjunni er staðsettur á samhverfa ásnúm með ± 1 mm frávik.
- 4.4. Liðnum sem takmarkar snúningsátakið skal komið þannig fyrir að lengdarás fremri hlutans standi hornrétt á ás stýrikerfisins með $\pm 2^\circ$ frávik og núningsvægi liðarins stillt á 650 Nm að lágmarki.
- 4.5. Þyngdarmiðja þeirra hluta höggbúnaðarins sem eru framan við liðinn sem takmarkar snúningsátakið, þ.m.t. öll áfest lóð, skal vera á miðlínu langsniðs höggbúnaðarins með 10 mm frávik.
- 4.6. Lengdin á milli miðlína álagsnemanna skal vera 310 ± 1 mm og þvermál fremri hlutans skal vera 50 ± 1 mm.

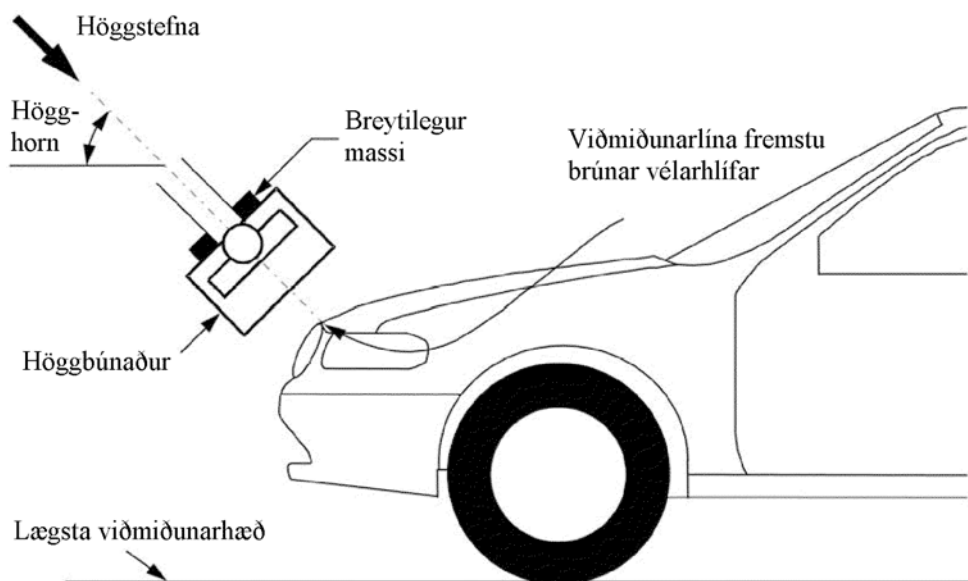
Mynd 4b

Höggbúnaður sem er prófunarlærleggur



Mynd 5

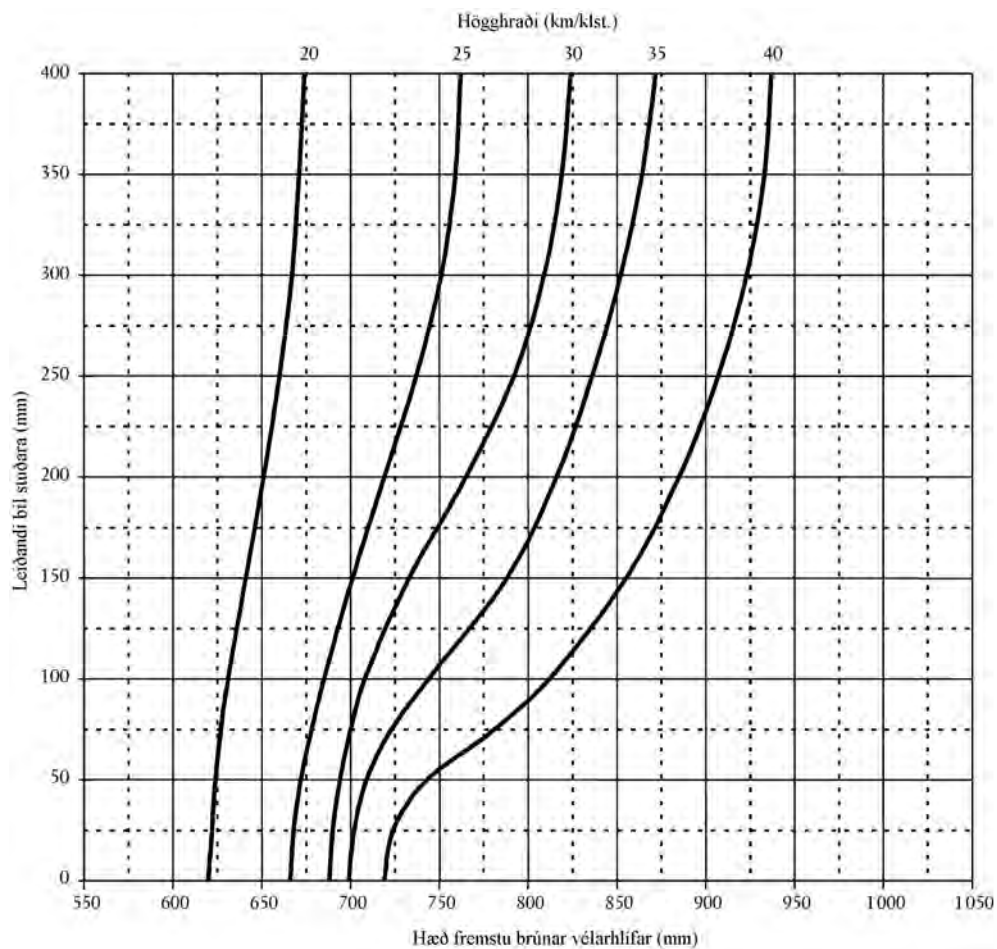
Prófanir með prófunarlærlegg í fremstu brún vélarhlífar



Mynd 6

Hraði í prófunum með prófunarlærlegg í fremstu brún vélarhlífar með tilliti til lögunar ökutækisins

Högghraði (km/klst.)

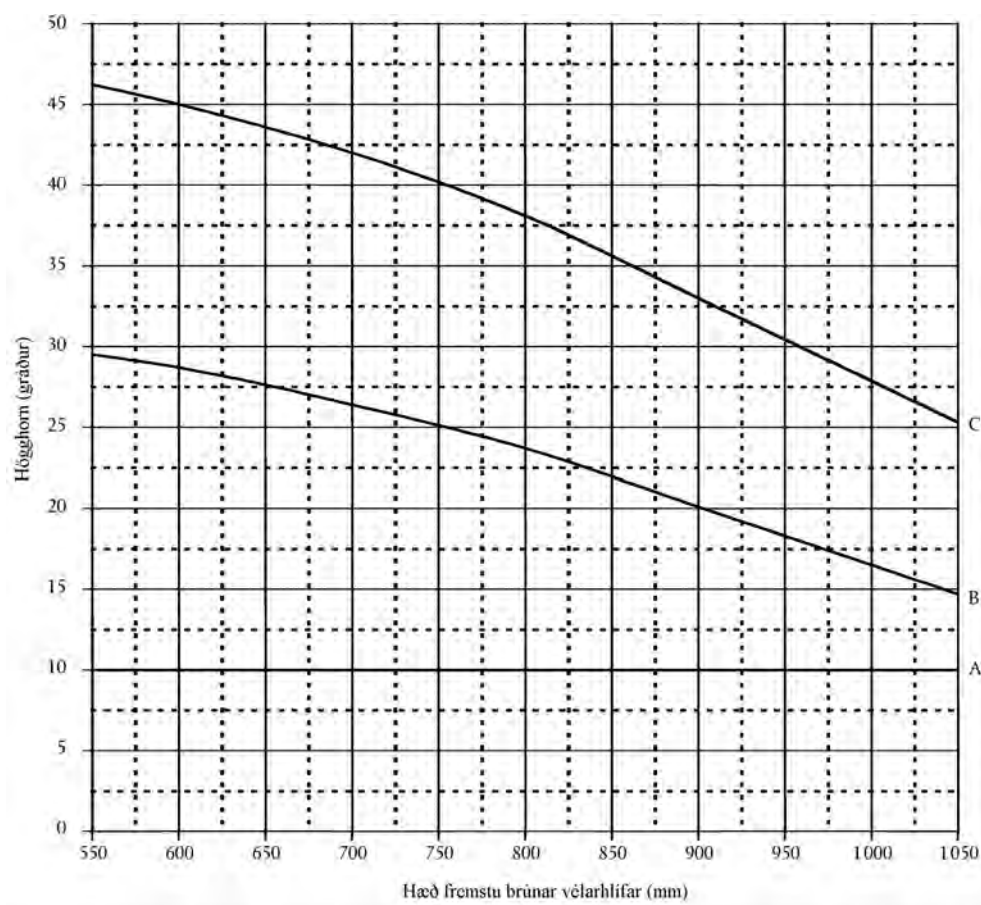


Athugasemdir:

1. Innreikna skal lárétt á milli ferlanna.
2. Samsetningar fyrir neðan 20 km/klst. skal prófa á 20 km/klst.
3. Samsetningar fyrir ofan 40 km/klst. skal prófa á 40 km/klst.
4. Þegar framsköggun stuðarans er neikvæð tala skal prófa eins og framsköggun stuðarans sé núll.
5. Þegar framsköggun stuðarans er meiri en 400 mm skal prófa eins og hún sé 400 mm.

Mynd 7

Horn í prófunum með prófunarlærlegg í fremstu brún vélarhlífar með tilliti til lögunar ökutækisins



Lykill:

A = 0 mm framsköggun stuðara

B = 50 mm framsköggun stuðara

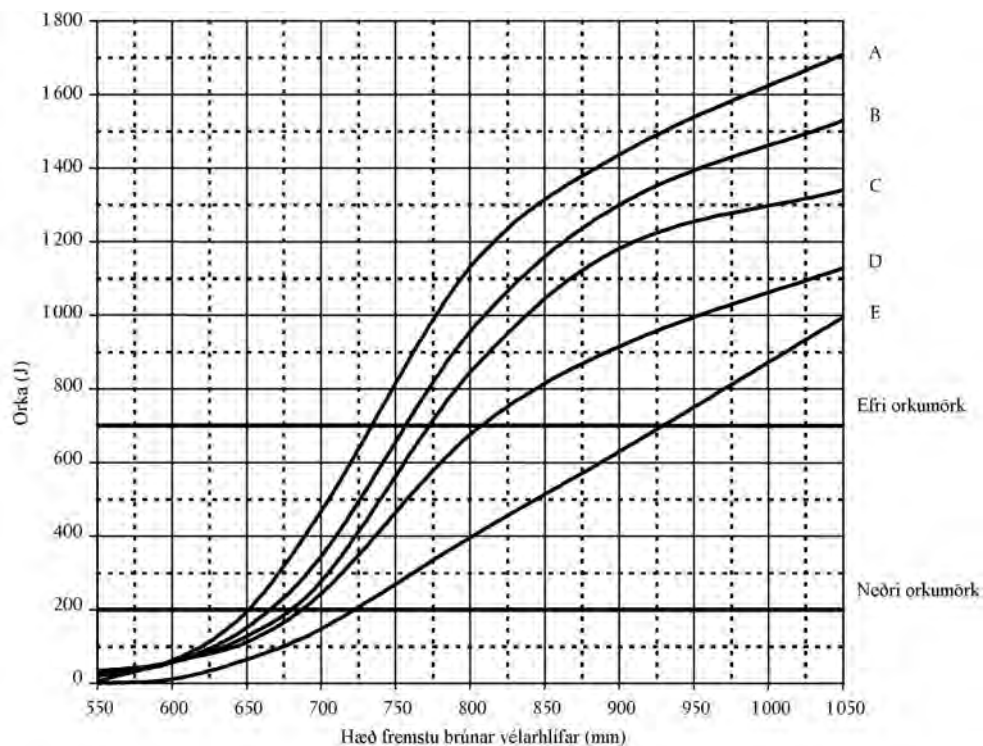
C = 150 mm framsköggun stuðara

Athugasemdir

1. Innreikna skal lóðrétt á milli ferlanna.
2. Þegar framsköggun stuðara er neikvæð tala skal prófa eins og framsköggun stuðara sé núll.
3. Þegar framsköggun stuðara er meiri en 150 mm skal prófa eins og hún sé 150 mm.
4. Þegar hæð fremstu brúnar vélarhlífar er meiri en 1 050 mm skal prófa eins og hún sé 1 050 mm.

Mynd 8

Hreyfiorka í prófunum með prófunarlærlegg í fremstu brún vélarhlífar með tilliti til lögunar ökutækisins



Lykill:

A = 50 mm framskögun stuðara

B = 100 mm framskögun stuðara

C = 150 mm framskögun stuðara

D = 250 mm framskögun stuðara

E = 350 mm framskögun stuðara

Athugasemdir

1. Innreikna skal lóðrétt á milli ferlanna.
2. Þegar framskögun stuðara er minni en 50 mm skal prófa eins og hún sé 50 mm.
3. Þegar framskögun stuðara er meiri en 350 mm skal prófa eins og hún sé 350 mm.
4. Þegar hæð fremstu brúnar vélarhlífar er meiri en 1 050 mm skal prófa eins og að hún sé 1 050 mm.
5. Þegar nauðsynleg hreyfiorka er meiri en 700 J skal prófa eins og hún sé 700 J.
6. Þegar nauðsynleg hreyfiorka er 200 J eða minni er prófunar ekki krafist.

V. KAFLI

Prófanir með höfuðlíkan barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju í efra borð vélarhlífur**1. Gildissvið**

Þessi prófunaraðferð gildir um kröfurnar í lið 3.1 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

2. Almenn ákvæði

2.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal í prófun í efra borð vélarhlífur vera á „óknúnu flugi“ við höggið. Höggbúnaðinum skal sleppt á óknúð flug í nægilegri fjarlægð frá ökutækinu þannig að snerting höggbúnaðarins við knúningskerfið í afturkasti höggbúnaðarins hafi ekki áhrif á prófunamiðurstöðurnar.

2.2. Höggbúnaðinn má knýja af stað með loft-, fjaður- eða vökvaprýstingi eða með öðrum aðferðum sem gefa sambærilega niðurstöðu.

3. Forskriftir prófunarinnar

3.1. Markmiðið með prófuninni er að tryggja að kröfurnar sem fram koma í lið 3.1.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB séu uppfylltar.

3.2. Prófanir með höggbúnaði sem er höfuðlíkan skulu vera í efra borð vélarhlífur eins og tilgreint er í lið 2.9 í I. hluta. Að minnsta kosti átján prófanir skulu framkvæmdar með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan, sex í miðju og á hvorn ytri þriðjung efra borðs vélarhlífurinnar, eins og lýst er í lið 2.9.8 í I. hluta, á staði sem taldir eru líklegastir til að valda meiðslum. Prófanirnar skulu gerðar á mismunandi hlutum stuðrans ef lögun hans er breytileg á svæðinu sem meta skal.

Af þeim átján prófunum sem framkvæma skal að lágmarki skulu a.m.k. tólf prófanir framkvæmdar með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan á „svæði A á efra borði vélarhlífur“ og a.m.k. sex á „svæði B á efra borði vélarhlífur“ eins og þau eru skilgreind í lið 3.3.

Prófunarstaðirnir skulu staðsettir þannig að ekki megi búast við því að höggbúnaðurinn strjúkst einungis við efra borði vélarhlífurinnar og skjótist þaðan í framrúðuna eða í A-stoð af meira afli. Prófunarstaðirnir sem valdir eru fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju skulu a.m.k. vera með 165 mm millibili og a.m.k. 82,5 mm frá skilgreindum hliðarviðmiðunarlínu vélarhlífurinnar og a.m.k. 82,5 mm framan við skilgreinda öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífurinnar. Allir prófunarstaðir sem valdir eru fyrir höfuðlíkan barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju skulu einnig vera a.m.k. 165 mm aftan við viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífurinnar nema að enginn staður á prófunarsvæði fremstu brúnar vélarhlífurinnar sem er 165 mm til hvorrar hliðar myndi, ef hann væri valinn fyrir prófun með prófunarlægg í fremstu brún vélarhlífur, þarfnast hreyfiorku í högginu sem væri meiri en 200 J.

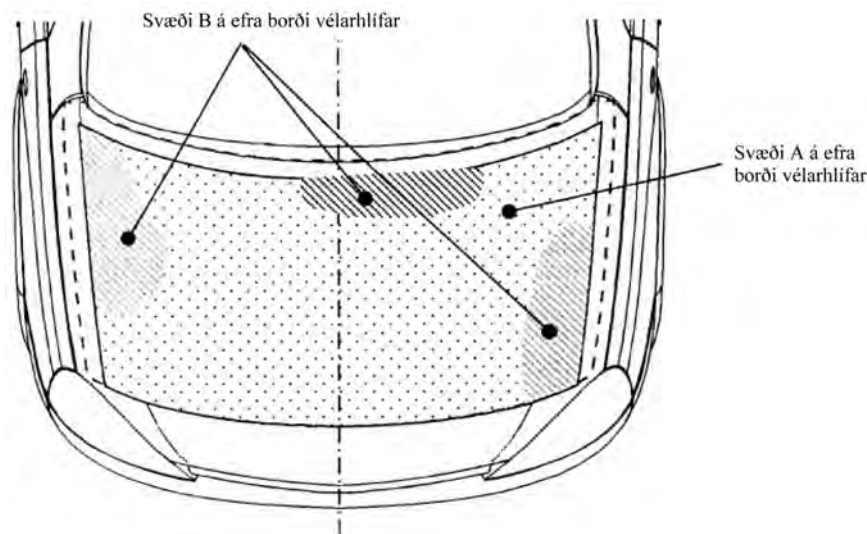
Þessar lágmarksfjarlægðir skulu mældar með sveigjanlegu bandi sem strekkt er eftir útlínunum ökutækisins. Ef nokkrir prófunarstaðir hafa verið valdir út frá líkum á því að þeir valdi meiðslum og prófunarsvæðið sem eftir stendur er of lítið til að velja annan prófunarstað og halda lágmarksbili milli prófana er heimilt að framkvæma færri en átján prófanir. Gera skal grein fyrir þeim stöðum sem rannsóknarstofurnar velja í prófunarskýrslunni.

Tæknipjónustan sem framkvæmir prófanirnar skal þó framkvæma nógu margar prófanir til að tryggja að ökutækið uppfylli skilyrðin um að HPC-viðmiðunargildið fari ekki yfir 1000 fyrir „svæði A á efra borði vélarhlífur“ og ekki yfir 2000 fyrir „svæði B á efra borði vélarhlífur“ einkum nálægt mörkum svæðisgerðanna.

3.3. „Svæði A á efra borði vélarhlífur“ og „svæði B á efra borði vélarhlífur“

3.3.1. Framleiðandi skal auðkenna svæðin á efra borði vélarhlífur þar sem álagsviðmið fyrir höfuð skulu ekki vera meiri en 1000 (svæði A á efra borði vélarhlífur) annars vegar og 2000 hins vegar (svæði B á efra borði vélarhlífur) í samræmi við tækniröfurnar sem settar eru fram í lið 3.1.2 í I. viðauka tilskipunarinnar (sjá mynd 9).

Mynd 9

Svæði A á efra borði vélarhlífar og svæði B á efra borði vélarhlífar

- 3.3.2. Merkingar á höggsvæði „efra borðs vélarhlífar“ og „svæði A á efra borði vélarhlífar“ og „svæði B á efra borði vélarhlífar“ skulu byggðar á teikningum sem framleiðandi lætur í té af lárétu plani ofan við ökutækið sem er samsíða lárétu núllplani ökutækisins. Framleiðandinn skal láta í té nægilega mörg x- og y- hnit til að merkja svæðin á ökutækinu sjálfu að teknu tilliti til útlínu efra borðs ökutækisins í stefnu z-ássins.
- 3.3.3. „Svæði A á efra borði vélarhlífar“ og „svæði B á efra borði vélarhlífar“ geta verið samsett úr nokkrum hlutum og skal fjöldi þeirra ekki takmarkaður.
- 3.3.4. Útreikningur á flatarmáli höggsvæðisins og flatarmáli „svæðis A á efra borði vélarhlífar“ og „svæðis B á efra borði vélarhlífar“ skal gerður á grundvelli vörpunar á vélarhlífinni þegar horft er á hana úr lárétu plani sem er samsíða lárétu núllplani ofan við ökutækið á grundvelli teikninga sem framleiðandinn lætur í té.
- 3.4. Prófunaraðferð
- 3.4.1. Prófunarbúnaður
- 3.4.1.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju skal vera ósveigjanleg kúla klædd með gervihúð og vera í samræmi við 4. lið þessa kafla og mynd 10 í þessum hluta. Þvermálið skal vera 165 ± 1 mm eins og sýnt er á mynd 10. Heildarmassi höggbúnaðarins skal vera $3,5 \pm 0,07$ kg.
- 3.4.1.2. Einum þríasa (eða þremur einása) hröðunarmæli skal komið fyrir í kúlunni miðri.
- 3.4.1.3. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 1000. Svörunargildið fyrir sveifluvíddarflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 500 g fyrir hröðunina.
- 3.4.1.4. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju skal uppfylla þær nothæfiskröfur sem tilgreindar eru í 4. lið í I. viðauka. Vottaða höggbúnaðinn má að hámarki nota 20 sinnum áður en endurvottun er þörf. Höggbúnaðinn skal einnig endurvotta ef meira en eitt ár er liðið frá síðustu vottun eða ef nemi á höggbúnaðinum hefur gefið frá sér merki sem fór yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluvíddarflokkinn.

- 3.4.1.5. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal festur, knúinn af stað og honum sleppt eins og tilgreint er í liðum 2.1 og 2.2.
- 3.4.2. Framkvæmd prófunar
- 3.4.2.1. Ástand ökutækisins eða undirkerfis þess skal vera í samræmi við kröfurnar í I. kafla þessa hluta. Stöðugt hitastig prófunarbúnaðarins og ökutækisins eða undirkerfisins skal vera $20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.
- 3.4.2.2. Prófanir skulu framkvæmdar á efra borð vélarhlífar innan þeirra marka sem tilgreind eru í liðum 3.2 og 3.4.2.3.
- Í prófunum aftarlega á efra borði vélarhlífarinnar skal höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan ekki snerta framrúðuna eða A-stoð áður en hann lendir á efra borði vélarhlífarinnar.
- 3.4.2.3. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan barns/smáfaxinnar fullorðinnar manneskju skal notaður í prófunum á efra borð vélarhlífar og skulu fyrstu snertipunktur afmarkast af 1000 mm ummálsfjarlægð og öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar eins og hún er skilgreind í lið 2.9.7 í I. hluta. Höggstefnan skal vera sú sem tilgreind er í lið 3.4.2.4 og högghraðinn sá sem tilgreindur er í lið 3.4.2.6.
- 3.4.2.4. Höggstefnan skal vera í lóðréttu plani fyrir framan og aftan þann hluta ökutækisins sem prófa skal. Frávik fyrir þessa stefnu er $\pm 2^\circ$. Höggstefnan í prófununum á efra borð vélarhlífarinnar skal vera niður á við og aftur eins og ökutækið væri á jörðinni. Högghornið í prófununum með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan barns/smáfaxinnar fullorðinnar manneskju skal mynda $50^\circ \pm 2^\circ$ horn með lægstu viðmiðunarhæð. Taka skal tillit til áhrifa þyngdarafsisins þegar högghornið er fengið úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.
- 3.4.2.5. Þegar höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan snertir fyrst skal frávikíð vera innan $\pm 10\text{ mm}$ frá höggstaðnum sem valinn hefur verið.
- 3.4.2.6. Högghraði höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan þegar hann lendir á efra borði vélarhlífarinnar skal vera $9,7 \pm 0,2\text{ m/s}$. Taka skal tillit til áhrifa þyngdarafsisins þegar högghraðinn er fenginn úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.

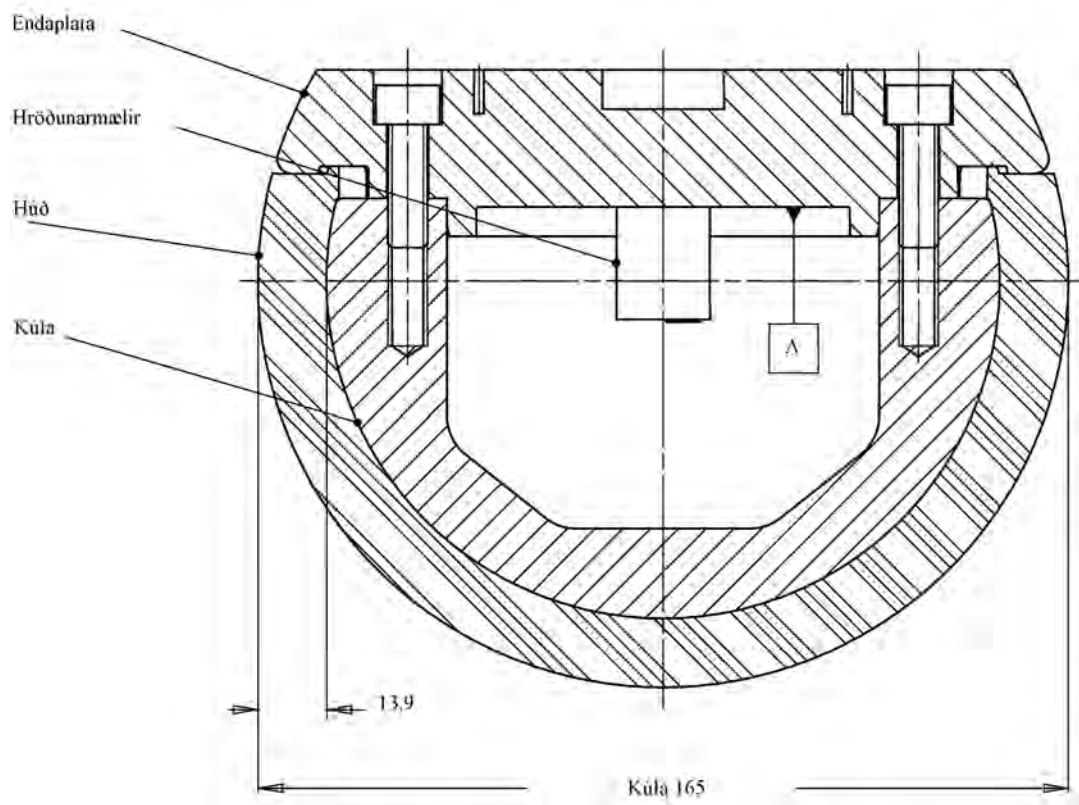
4. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan barns/smáfaxinnar fullorðinnar manneskju

- 4.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns/smáfaxinnar fullorðinnar manneskju skal vera kúla úr áli og af einsleitri gerð.
- 4.2. Kúlan skal klædd með $13,9 \pm 0,5\text{ mm}$ þykkri gervihúð sem skal þekja a.m.k. hálfa kúluna.
- 4.3. Þyngdarmiðja höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan barns/smáfaxinnar fullorðinnar manneskju, þ.m.t. tækjabúnaður, skal vera í miðju kúlunnar með $\pm 5\text{ mm}$ frávik. Hverfitregða um ás í gegnum þyngdarmiðjuna og hornrétt á höggstefnuna skal vera $0,010 \pm 0,0020\text{ kg/m}^2$.
- 4.4. Í dæld í kúlunni skal vera hægt að koma fyrir einum þríása eða þremur einása hröðunarmælum. Hröðunarmælunum skal komið fyrir í samræmi við liði 4.4.1 og 4.4.2.
- 4.4.1. Næmi ásinn á einum af hröðunarmælunum skal snúa hornrétt á áfestingarplötu A (mynd 10) og skjálftamassi hans skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 1 mm geisla og er 20 mm að lengd. Miðlína frávikssvæðisins skal liggja hornrétt á áfestingarplötuna og miðpunktur hennar skal vera sá sami og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.

- 4.4.2. Næmu ásarir á hinum hröðunarmælunum skulu snúa hornrétt á hvorn annan og vera samsíða áfestingarplötu A og skjálftamassi þeirra skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 10 mm radíus. Miðja frávikssvæðisins skal vera sú sama og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.

Mynd 10

Höggbúnaður sem er höfuðlíkan barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju (stærðir í mm)



VI. KAFLI

Prófanir með höfuðlíkani fullorðinnar manneskju í framrúðu

1. Gildissvið

Þessi prófunaraðferð gildir um kröfurnar í lið 3.1 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

2. Almenn ákvæði

- 2.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal í prófun í efra borð framrúðu vera á „óknúnu flugi“ við höggið. Höggbúnaðinum skal sleppt á óknúð flug í nægilegri fjarlægð frá ökutækinu svo snerting höggbúnaðarins við knúningskerfið í afturkasti höggbúnaðarins hafi ekki áhrif á prófunamiðurstöðurnar.
- 2.2. Höggbúnaðinn má knýja af stað með loft-, fjaður- eða vökvaprýstingi eða með öðrum aðferðum sem gefa sambærilega niðurstöðu.

3. Forskriftir prófunarinnar

- 3.1. Markmiðið með prófuninni er að tryggja að kröfurnar sem fram koma í lið 3.1.4 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB séu uppfylltar.

- 3.2. Prófanirnar með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skulu vera í framrúðu. Að minnsta kosti fimm prófanir skulu framkvæmdar með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan á staði sem taldir eru líklegastir til að valda meiðslum.

Prófunarstaðirnir sem valdir eru fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju í framrúðu skulu a.m.k. vera með 165 mm millibili og a.m.k. 82,5 mm frá mörkum framrúðunnar eins og þau eru skilgreind í tilskipun 77/649/EBE og a.m.k. 82,5 mm framan við öftustu viðmiðunarlínu framrúðunnar eins og hún er skilgreind í lið 2.11.1 í I. hluta (sjá mynd 11).

Þessar lágmarksfjarlægðir skulu mældar með sveigjanlegu bandi sem strekkt er eftir útlínunum ökutækisins. Ef nokkrir prófunarstaðir hafa verið valdir út frá líkum á því að þeir valdi meiðslum og prófunarsvæðið sem eftir stendur er of lítið til að velja annan prófunarstað og halda lágmarksbili milli prófana er heimilt að framkvæma færri en fimm prófanir. Gera skal grein fyrir þeim stöðum sem rannsóknarstofurnar velja í prófunarskýrslunni.

- 3.3. Innan svæðisins sem lýst er í lið 3.2 skulu öll svæði teljast sambærileg.

3.4. *Prófunaraðferð*

3.4.1. Prófunarbúnaður

- 3.4.1.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal vera ósveigjanleg kúla klædd með gervihúð og vera í samræmi við 4. lið þessa kafla og mynd 12 í þessum hluta. Þvermálið skal vera 165 ± 1 mm eins og sýnt er á mynd 12. Heildarmassi höggbúnaðarins, þ.m.t. tækjabúnaður, skal vera $4,8 \pm 0,1$ kg.

- 3.4.1.2. Einum þríasa (eða þremur einása) hröðunarmæli skal komið fyrir í kúlunni miðri.

- 3.4.1.3. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 1000. Svörunargildið fyrir sveifluvíddarflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 500 g fyrir hröðunina.

- 3.4.1.4. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal uppfylla þær nothæfiskröfur sem tilgreindar eru í 4. lið í I. viðauka. Vottaða höggbúnaðinn má að hámarki nota 20 sinnum áður en endurvottun er þörf. Höggbúnaðinn skal einnig endurvotta ef meira en eitt ár er liðið frá síðustu vottun eða ef nemi á höggbúnaðinum hefur gefið frá sér merki sem fór yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluvíddarflokkinn.

- 3.4.1.5. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal festur, knúinn af stað og honum sleppt eins og tilgreint er í liðum 2.1 og 2.2.

3.4.2. Framkvæmd prófunar

- 3.4.2.1. Ástand ökutækisins eða undirkerfis þess skal vera í samræmi við kröfurnar í I. kafla þessa hluta. Stöðugt hitastig prófunarbúnaðarins og ökutækisins eða undirkerfisins skal vera $20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.

- 3.4.2.2. Prófanir skulu framkvæmdar á efra borð framrúðu innan þeirra marka sem tilgreind eru í lið 3.2.

- 3.4.2.3. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju og er skilgreindur í lið 3.4.1 skal notaður í prófunum í framrúðu og fyrstu snertipunktur liggja milli markanna sem lýst er í lið 3.4.2.2.

Höggstefnan skal vera sú sem tilgreind er í lið 3.4.2.4 og höggghraðinn sá sem tilgreindur er í lið 3.4.2.6.

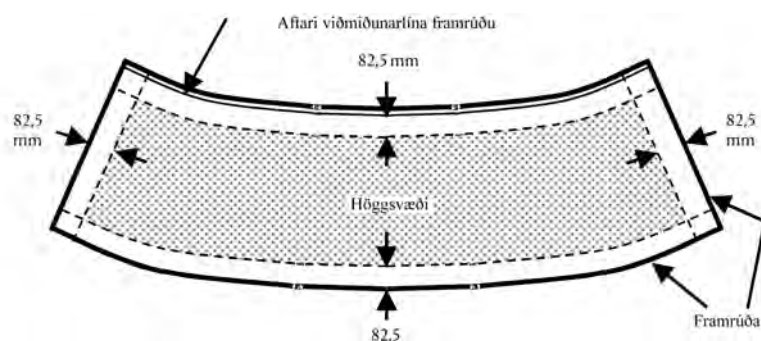
- 3.4.2.4. Höggstefnan skal vera í lóðréttu plani fyrir framan og aftan þann hluta ökutækisins sem prófa skal. Frávik fyrir þessa stefnu er $\pm 2^\circ$. Högghornið skal mynda $35^\circ \pm 2^\circ$ horn með lægstu viðmiðunarhæð. Taka skal tillit til áhrifa þyngdaraflsins þegar högghornið er fengið úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.
- 3.4.2.5. Þegar höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan snertir fyrst skal frávikið vera innan ± 10 mm frá höggstaðnum sem valinn hefur verið.
- 3.4.2.6. Högghraði höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan þegar hann lendir á efra borði framrúðunnar skal vera $9,7 \pm 0,2$ m/s. Taka skal tillit til áhrifa þyngdaraflsins þegar högghraðinn er fenginn úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.

4. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju

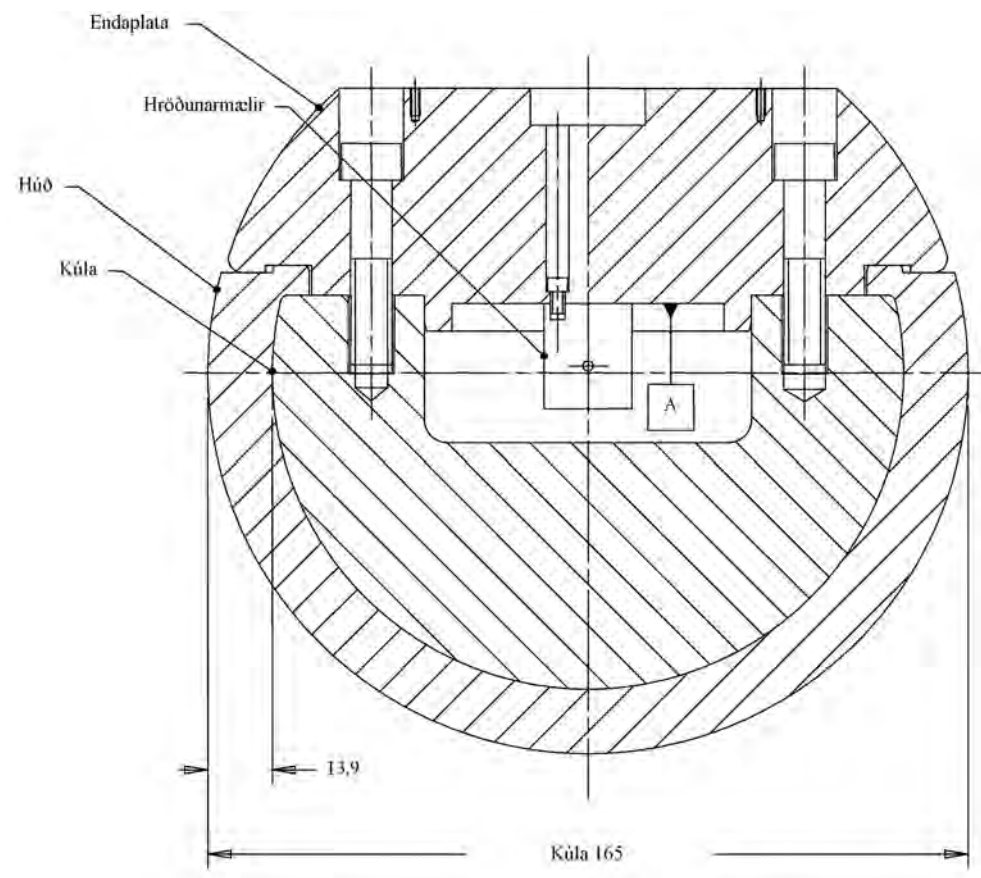
- 4.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal vera kúla úr áli og af einsleitri gerð.
- 4.2. Kúlan skal klædd með $13,9 \pm 0,5$ mm þykkri gervihúð sem skal þekja a.m.k. hálfa kúluna.
- 4.3. Þyngdarmiðja höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju, þ.m.t. tækjabúnaður, skal vera í miðju kúlunnar með ± 5 mm fráviki. Hverfitregða um ás í gegnum þyngdarmiðjuna og hornrétt á höggstefnuna skal vera $0,0125 \pm 0,0010$ kg/m².
- 4.4. Í dæld í kúlunni skal vera hægt að koma fyrir einum þríasa eða þremur einása hröðunarmælum. Hröðunarmælunum skal komið fyrir í samræmi við liði 4.4.1 og 4.4.2.
- 4.4.1. Næmi ásinn á einum af hröðunarmælunum skal snúa hornrétt á áfestingarplötu A (mynd 12) og skjálftamassi hans skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 1 mm geisla og er 20 mm að lengd. Miðlína frávikssvæðisins skal liggja hornrétt á áfestingarplötuna og miðpunktur hennar skal vera sá sami og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.
- 4.4.2. Næmu ásarnir á hinum hröðunarmælunum skulu snúa hornrétt á hvorn annan og vera samsíða áfestingarplötu A og skjálftamassi þeirra skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 10 mm geisla. Miðja frávikssvæðisins skal vera sú sama og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.

Mynd 11

Höggsvæði á framrúðu



Mynd 12

Höggbúnaður sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju (stærðir í mm)

VII. KAFLI

Prófanir með höfuðlíkani barns og fullorðinnar manneskju í efra borð vélarhlífar**1. Gildissvið**

Þessi prófunaraðferð gildir um kröfurnar í lið 3.2 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB.

2. Almenn ákvæði

- 2.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal í prófun í efra borð vélarhlífar vera á „óknúnu flugi“ við höggið. Höggbúnaðinum skal sleppt á óknúð flug í nægilegri fjarlægð frá ökutækinu svo snerting höggbúnaðarins við knúningskerfið í afturkasti höggbúnaðarins hafi ekki áhrif á prófunarniðurstöðurnar.
- 2.2. Höggbúnaðinn má knýja af stað með loft-, fjaður- eða vökvaþrýstingi eða með öðrum aðferðum sem gefa sambærilega niðurstöðu.

3. Forskriftir prófunarinnar

- 3.1. Markmiðið með prófuninni er að tryggja að kröfurnar sem fram koma í liðum 3.2.2 og 3.2.4 í I. viðauka við tilskipun 2003/102/EB séu uppfylltar.

3.2. Prófanir með höggbúnaði sem er höfuðlíkan skulu verið í efra borð vélarhlífar eins og tilgreint er í lið 2.9 í I. hluta. Prófanir í fremri hluta efra borðs vélarhlífar sem skilgreindur er í lið 3.4.2.3 skulu framkvæmdar með höggbúnaði sem er höfuðlíkan barns og skilgreindur er í lið 3.4.1.1. Prófanir á aftari hluta efra borðs vélarhlífar sem skilgreindur er í lið 3.4.2.4 skulu framkvæmdar með höggbúnaði sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju og skilgreindur er í lið 3.4.1.1. Að minnsta kosti níu prófanir skulu framkvæmdar með hvorum höggbúnaði sem er höfuðlíkan, þrjár í miðju og á hvorn ytri þriðjung fremra og aftara ytra borðs vélarhlífarinnar, eins og lýst er í lið 2.9.8 í I. hluta, á staði sem taldir eru líklegastir til að valda meiðslum. Prófanirnar skulu gerðar á mismunandi hlutum stuðarans ef lögun hans er breytileg á svæðinu sem meta skal.

3.3. Prófunarstaðirnir sem valdir eru fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skulu a.m.k. vera með 165 mm millibili og a.m.k. 82,5 mm frá skilgreindum hliðarviðmiðunarlínunum vélarhlífarinnar og a.m.k. 82,5 mm framan við skilgreinda öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar. Prófunarstaðirnir skulu staðsettir þannig að ekki megi búast við því að höggbúnaðurinn strjúkst einungis við efra borði vélarhlífarinnar og skjótist þaðan í framrúðuna eða í A-stað af meira afli. Prófunarstaðirnir sem valdir eru fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan barns skulu a.m.k. vera með 130 mm millibili og a.m.k. 65 mm frá skilgreindum hliðarviðmiðunarlínunum vélarhlífarinnar og a.m.k. 65 mm framan við skilgreinda öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar. Allir prófunarstaðir sem valdir eru fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan barns skulu vera a.m.k. 130 mm aftan við viðmiðunarlínu fremstu brúnar vélarhlífarinnar nema að enginn staður á prófunarsvæði fremstu brúnar vélarhlífarinnar sem er 130 mm til hvorrar hliðar myndi, ef hann væri valinn fyrir prófun með prófunarlæglegg í fremstu brún vélarhlífar, þarfnast hreyfiorku í högginu sem væri meiri en 200 J.

Þessar lágmarksfjarlægðir skulu mældar með sveigjanlegu bandi sem strekkt er eftir útlínunum ökutækisins. Ef nokkrir prófunarstaðir hafa verið valdir út frá líkum á því að þeir valdi meiðslum og prófunarsvæðið sem eftir stendur er of lítið til að velja annan prófunarstað og halda lágmarksbili milli prófana er heimilt að framkvæma færri en níu prófanir. Gera skal grein fyrir þeim stöðum sem rannsóknarstofurnar velja í prófunarskýrslunni.

3.4. *Prófunaraðferð*

3.4.1. Prófunarbúnaður

3.4.1.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju og höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns skal vera ósveigjanleg kúla klædd með gervihúð og vera í samræmi við 4. lið þessa kafla og myndir 13 og 14 í þessum hluta. Þvermál höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal vera 165 ± 1 mm og þvermál höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan barns skal vera 130 ± 1 mm eins og sýnt er á myndum 13 og 14. Heildarmassi höggbúnaðarins, þ.m.t. tækjabúnaður, skal vera $4,8 \pm 0,1$ kg fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju og $2,5 \pm 0,05$ kg fyrir höggbúnaðinn sem er höfuðlíkan barns.

3.4.1.2. Einum þríasa (eða þremur einása) hröðunarmæli skal komið fyrir í kúlunni miðri á hvorum höggbúnaði sem er höfuðlíkan barns og fullorðinnar manneskju.

3.4.1.3. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 1000. Svörunargildið fyrir sveifluviddarflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 500 g fyrir hröðunina.

3.4.1.4. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal uppfylla þær nothæfiskröfur sem tilgreindar eru í 4. lið í I. viðauka. Vottaða höggbúnaðinn má að hámarki nota 20 sinnum áður en endurvottunar er þörf. Höggbúnaðinn skal einnig endurvotta ef meira en eitt ár er liðið frá síðustu vottun eða ef nemi á höggbúnaðinum hefur gefið frá sér merki sem fór yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluviddarflokkinn.

3.4.1.5. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal festur, knúinn af stað og honum sleppt eins og tilgreint er í liðum 2.1 og 2.2.

3.4.2. Framkvæmd prófunar

3.4.2.1. Ástand ökutækisins eða undirkerfis þess skal vera í samræmi við kröfurnar í I. kafla þessa hluta. Stöðugt hitastig prófunarbúnaðarins og ökutækisins eða undirkerfisins skal vera $20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.

- 3.4.2.2. Prófanir skulu framkvæmdar á efra borð vélarhlífar innan þeirra marka sem tilgreind eru í liðum 3.2, 3.4.2.3 og 3.4.2.4.

Í prófunum aftarlega á efra borði vélarhlífarinnar skal höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan ekki snerta framrúðuna eða A-stoð áður en hann lendir á efra borði vélarhlífarinnar.

- 3.4.2.3. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan barns og er skilgreindur í lið 3.4.1 skal notaður í prófunum í fremri hluta efra borðs vélarhlífar og skulu fyrstu snertipunktur afmarkast af 1000 mm og 1500 mm ummálsfjarlægð eða af öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar eins og hún er skilgreind í málsgrein 2.9.7 í I. hluta. Höggstefnan skal vera sú sem tilgreind er í lið 3.4.2.5 og höggghraðinn sá sem tilgreindur er í lið 3.4.2.7.

- 3.4.2.4. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju og er skilgreindur í lið 3.4.1 skal notaður í prófunum í aftari hluta efra borðs vélarhlífar og skulu fyrstu snertipunktur afmarkast af 1500 mm og 2100 mm ummálsfjarlægð eða af öftustu viðmiðunarlínu vélarhlífarinnar eins og hún er skilgreind í málsgrein 2.9.7 í I. hluta. Höggstefnan skal vera sú sem tilgreind er í lið 3.4.2.5 og höggghraðinn sá sem tilgreindur er í lið 3.4.2.7.

- 3.4.2.5. Höggstefnan skal vera í lóðréttu plani fyrir framan og aftan þann hluta ökutækisins sem prófa skal. Frávik fyrir þessa stefnu er $\pm 2^\circ$. Höggstefnan í prófununum á efra borð vélarhlífarinnar skal vera niður á við og aftur eins og ökutækið væri á jörðinni. Högghornið í prófununum með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan barns skal mynda $50^\circ \pm 2^\circ$ horn með lægstu viðmiðunarhæð. Högghornið í prófununum með höggbúnaðinum sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal mynda $65^\circ \pm 2^\circ$ horn með lægstu viðmiðunarhæð. Taka skal tillit til áhrifa þyngdaraflsins þegar högghornið er fengið úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.

- 3.4.2.6. Þegar höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan snertir fyrst skal frávikíð vera innan ± 10 mm frá höggstaðnum sem valinn hefur verið.

- 3.4.2.7. Höggghraði höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan þegar hann lendir á efra borði vélarhlífarinnar skal vera $11,1 \pm 0,2$ m/s. Taka skal tillit til áhrifa þyngdaraflsins þegar höggghraðinn er fenginn úr mælingum sem gerðar eru áður en fyrsta snerting verður.

4. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan

4.1. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju

- 4.1.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju skal vera kúla úr áli og af einsleitri gerð.

- 4.1.2. Kúlan skal klædd með $13,9 \pm 0,5$ mm þykkri gervihúð sem skal þekja a.m.k. hálfa kúluna.

- 4.1.3. Þyngdarmiðja höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju, þ.m.t. tækjabúnaður, skal vera í miðju kúlunnar með ± 5 mm frávik. Hverfitregða um ás í gegnum þyngdarmiðjuna og hornrétt á höggstefnuna skal vera $0,0125 \pm 0,0010$ kg/m².

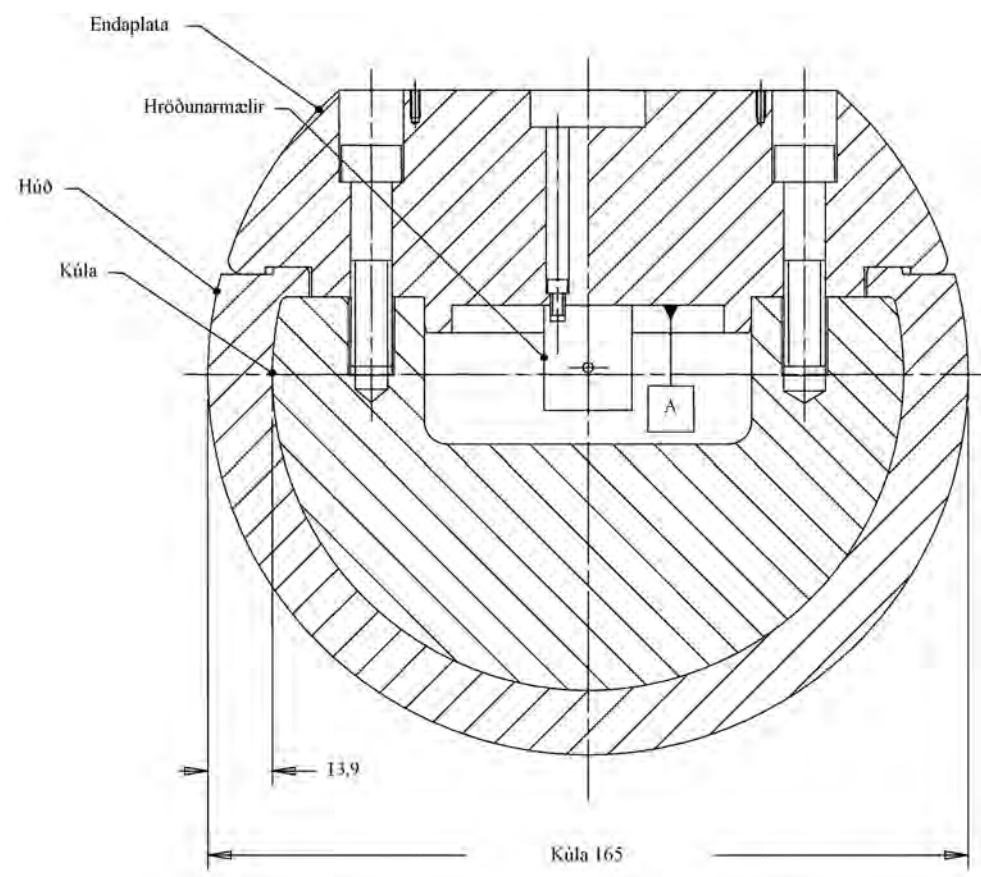
- 4.1.4. Í dæld í kúlunni skal vera hægt að koma fyrir einum þríása eða þremur einása hröðunarmælum. Hröðunarmælunum skal komið fyrir í samræmi við liði 4.1.4.1 og 4.1.4.2.

- 4.1.4.1. Næmi ásinn á einum af hröðunarmælunum skal snúa hornrétt á áfestingarplötu A (mynd 13) og skjálftamassi hans skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 1 mm geisla og er 20 mm að lengd. Miðlína frávikssvæðisins skal liggja hornrétt á áfestingarplötuna og miðpunktur hennar skal vera sá sami og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.

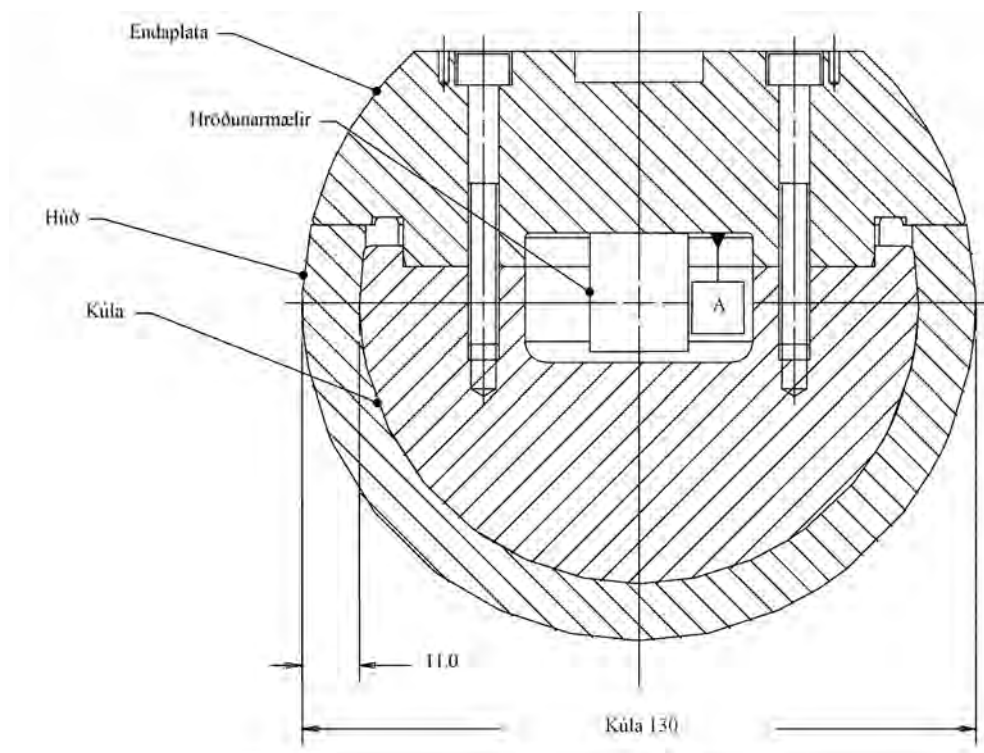
- 4.1.4.2. Næmu ásarnir á hinum hröðunarmælunum skulu snúa hornrétt á hvorn annan og vera samsíða áfestingarplötu A og skjálftamassi þeirra skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 10 mm geisla. Miðja frávikssvæðisins skal vera sú sama og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.

- 4.2. Höggbúnaður sem er höfuðlíkan barns
- 4.2.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns skal vera kúla úr áli og af einsleitri gerð.
- 4.2.2. Kúlan skal klædd með $11,0 \pm 0,5$ mm þykkri gervihúð sem skal þekja a.m.k. hálfa kúluna.
- 4.2.3. Þyngdarmiðja höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan barns, þ.m.t. tækjabúnaður, skal vera í miðju kúlunnar með ± 5 mm frávik. Hverfitregða um ás í gegnum þyngdarmiðjuna og hornrétt á höggstefnuna skal vera $0,0036 \pm 0,0003$ kg/m².
- 4.2.4. Í dæld í kúlunni skal vera hægt að koma fyrir einum þríása eða þremur einása hröðunarmælum. Hröðunarmælunum skal komið fyrir í samræmi við liði 4.2.4.1 og 4.2.4.2.
- 4.2.4.1. Næmi ásin á einum af hröðunarmælunum skal snúa hornrétt á áfestingarplötu A (mynd 14) og skjálftmassi hans skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 1 mm geisla og er 20 mm að lengd. Miðlína frávikssvæðisins skal liggja hornrétt á áfestingarplötuna og miðpunktur hennar skal vera sá sami og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.
- 4.2.4.2. Næmu ásarnir á hinum hröðunarmælunum skulu snúa hornrétt á hvorn annan og vera samsíða áfestingarplötu A og skjálftmassi þeirra skal vera staðsettur innan sívalningslaga frávikssvæðis sem er með 10 mm geisla. Miðja frávikssvæðisins skal vera sú sama og miðja kúlu höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan.

Mynd 13

Höggbúnaður sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju (stærðir í mm)

Mynd 14

Höggbúnaður sem er höfuðlíkan barns (stærðir í mm)

I. viðbætur

VOTTUN HÖGGBÚNAÐAR

1. Vottunarkröfur

- 1.1. Þess er krafist að höggbúnaðurinn sem notaður er í prófununum sem lýst er í II. hluta uppfylli viðeigandi nothæfiskröfur.

Kröfur varðandi höggbúnað sem er prófunarfótleggur eru tilgreindar í 2. lið, kröfur varðandi höggbúnað sem er prófunarlærleggur eru tilgreindar í 3. lið og kröfur varðandi höggbúnað sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju, barns og barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju eru tilgreindar í 4. lið.

2. Höggbúnaður sem er prófunarfótleggur

2.1. Kyrrstöðuprófanir

- 2.1.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarfótleggur skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í lið 2.1.2 þegar hann er prófaður eins og tilgreint er í lið 2.1.4 og höggbúnaðurinn skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í lið 2.1.3 þegar hann er prófaður eins og tilgreint er í lið 2.1.5.

Í báðum prófunum skal staða höggbúnaðarins á lengdarásnum vera þannig að hnjáliðurinn virki rétt með $\pm 2^\circ$ frávik.

Stöðugt hitastig höggbúnaðarins skal vera $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ meðan á vottuninni stendur.

Svörunargildin fyrir sveifluvíddarflokkinn eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skulu vera 50° fyrir hornið sem hnéð beygist í og 500 N fyrir kraftinn sem beitt er þegar höggbúnaðurinn er sveigður í samræmi við kröfurnar í lið 2.1.4 og 10 mm fyrir skerfærsluna og 10 kN fyrir kraftinn sem beitt er þegar höggbúnaðurinn er beittur skerfærslu í samræmi við kröfurnar í lið 2.1.5. Í báðum prófununum er heimilt að beita lághleypisúni á viðeigandi tíðnisviði til að útiloka truflun frá hærri tíðnisviðum án þess að hafa veruleg áhrif á mælinguna á svörun höggbúnaðarins.

- 2.1.2. Þegar höggbúnaðurinn er sveigður í samræmi við kröfurnar í lið 2.1.4 skal krafturinn sem beitt er/svörun beygjuhornsins vera innan þeirra marka sem sýnd eru á mynd 1. Að auki skal sú orka sem þarf til að framkalla $15,0^\circ$ beygju vera $100 \pm 7\text{ J}$.

- 2.1.3. Þegar höggbúnaðurinn er beittur skerfærslu í samræmi við kröfurnar í lið 2.1.5 skal krafturinn sem beitt er/svörun skerfærslunnar vera innan þeirra marka sem sýnd eru á mynd 2.

- 2.1.4. Höggbúnaðurinn sem er prófunarfótleggur skal festur án frauð- og húðklæðningar þannig að sköflungurinn sé klemmdur á fastan láréttan flöt og málmrör tengt þétt við lærlegginn eins og sýnt er á mynd 3. Til að koma í veg fyrir núningsskekkjur skal enginn stuðningur vera við lærlegginn eða málmrörið. Beygjukraftvægið sem lendir á miðju hnjáliðarins vegna þyngdar málmrörsins og annarra íhluta (að undanskildum prófunarfótleggnum sjálfum) skal ekki vera meira en 25 Nm.

Láréttum þverkrafti skal beitt á málmrörið í $2,0 \pm 0,01\text{ m}$ fjarlægð frá miðju hnjáliðarins og stærð hornsins sem sveigja hnésins myndar skráð. Álagið skal aukið þangað til sveigja hnésins er orðin meiri en 22° .

Orkan er reiknuð með því að heilda kraftinn með tilliti til beygjuhornsins í bogaeiningum og margfalda með lengd armsins sem er $2,0 \pm 0,01\text{ m}$.

- 2.1.5. Höggbúnaðurinn sem er prófunarfótleggur skal festur án frauð- og húðklæðningar þannig að sköflungurinn sé klemmdur á fastan láréttan flöt og málmrör tengt þétt við lærlegginn og fest $2,0\text{ m}$ frá miðju hnésins eins og sýnt er á mynd 4.

Láréttum þverkrafti skal beitt á lærlegginn í 50 mm fjarlægð frá miðju hnjáliðarins og stærð hornsins sem myndast við skerfærslu hnésins skráð. Álagið skal aukið þangað til skerfærsla hnésins er orðin meiri en $8,0\text{ mm}$ eða álagið meira en $6,0\text{ kN}$.

2.2. Hreyfiprófanir

- 2.2.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarfótleggur skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í lið 2.2.2 þegar hann er prófaður eins og tilgreint er í lið 2.2.4.

Stöðugt hitastig höggbúnaðarins skal vera $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ meðan á vottuninni stendur.

- 2.2.2. Þegar höggbúnaðurinn verður fyrir höggi frá vottunarhöggbúnaði sem er stýrt línulega eins og tilgreint er í lið 2.2.4 skal hámarkshröðun efri hluta sköflungsins ekki vera minni en 120 g og ekki meiri en 250 g. Hámarksbeygjuhornið skal ekki vera minna en $6,2^{\circ}$ og ekki stærra en $8,2^{\circ}$. Hámarksskerfærslan skal ekki vera minni en 3,5 mm og ekki meiri en 6,0 mm.

Niðurstöðurnar sem notaðar eru til að afla þessara gilda skulu koma úr upphaflega högginu við vottunarhöggbúnaðinn og ekki úr stöðvunarfasanum. Kerfi sem notað er til að stöðva höggbúnaðinn eða vottunarhöggbúnaðinn skal vera uppsett þannig að stöðvunarfásinn skarist ekki í tíma við upphaflega höggið. Stöðvunarkerfið skal ekki verða þess valdandi að merkin frá nemunum fari yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluvíddarflokkinn.

- 2.2.3. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 180 fyrir alla nema. Svörunargildin fyrir sveifluvíddarflokkinn eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skulu vera 50° fyrir hornið sem hnéð beygist í, 10 mm fyrir skerfærsluna og 500 g fyrir hröðunina. Þetta merkir ekki að höggbúnaðurinn sjálfur verði að geta sveigst og færst sem nemur þessum tölum.

2.2.4 Framkvæmd prófunar

- 2.2.4.1. Höggbúnaðurinn skal vera með frauð- og húðklæðningu og hengdur lárétt úr þremur vírum sem skulu vera $1,5 \pm 0,2$ mm í þvermál og a.m.k. 2,0 m að lengd eins og sýnt er á mynd 5a. Hann skal hanga með lengdarásinn láréttan með $\pm 0,5^{\circ}$ frávik og hornrétt á stefnu vottunarhöggbúnaðarins með $\pm 2^{\circ}$ frávik. Staða höggbúnaðarins á lengdarásnum vera þannig að hnjáliðurinn virki rétt með $\pm 2^{\circ}$ frávik. Höggbúnaðurinn skal uppfylla kröfurnar í lið 3.4.1.1 í II kafla í II. hluta þegar búíð er að setja festingarnar fyrir vörinn á.

- 2.2.4.2. Massi vottunarhöggbúnaðarins skal vera $9,0 \pm 0,05$ kg og tekur það til þeirra hluta knúnings- og stýrikerfisins sem eru áfastir höggbúnaðinum þegar höggið verður. Mál framhliðar vottunarhöggbúnaðarins skulu vera þau sem tilgreind eru á mynd 5b. Framhlið vottunarhöggbúnaðarins skal vera úr áli og þakin yfirborðsefni sem er þykkara en 2,0 míkrometrar.

Stýrikerfið skal útbúið með brautum með litla núningsmótstöðu sem eru ekki næmar fyrir álagi utan stefnu ássins og gera höggbúnaðinum kleift að ferðast eingöngu í tilgreinda höggstefnu þegar það snertir ökutækið. Brautirnar skulu hindra hreyfingu í aðrar áttir þ.m.t. snúning um einhvern ásanna.

- 2.2.4.3. Frauðið á höggbúnaðinum skal ekki hafa verið notað áður þegar hann er vottaður.

- 2.2.4.4. Frauðið sem notað er á höggbúnaðinn skal ekki meðhöndlað eða aflagað of mikið fyrir eða eftir áfestingu eða meðan á henni stendur.

- 2.2.4.5. Vottunarhöggbúnaðurinn skal knúinn af stað lárétt á $7,5 \pm 0,1$ m/s hraða á kyrrstæðan höggbúnaðinn eins og sýnt er á mynd 5a. Vottunarhöggbúnaðurinn skal staðsettur þannig að miðlína hans skeri miðlínu sköflungsins í 50 mm fjarlægð frá miðju hnésins með ± 3 mm frávik til hliðanna og ± 3 mm frávik lóðrétt.

3. Höggbúnaður sem er prófunarlærleggur

- 3.1. Höggbúnaðurinn sem er prófunarlærleggur skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í lið 3.2 þegar hann er prófaður eins og tilgreint er í lið 3.3.

Stöðugt hitastig höggbúnaðarins skal vera $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ meðan á vottuninni stendur.

3.2. *Kröfur*

- 3.2.1. Þegar höggbúnaðurinn er knúinn af stað á kyrrstæðan, sívalan kólf skal hámarkskrafturinn sem mældur er af hverjum álagsnema ekki vera minni en 1,20 kN og ekki meiri en 1,55 kN og mismunurinn á hámarkskraftinum sem mælist í efsta og neðsta álagsnemanum skal ekki vera meiri en 0,10 kN. Að auki skal hámarksbeygjukraftvægið sem þannemarnir mæla ekki vera minna en 190 Nm og ekki meira en 250 Nm í miðstöðunni og ekki minna en 160 Nm og ekki meira en 220 Nm í ytri stöðunni. Mismunurinn á milli efri og neðri marka hámarksbeygjukraftvægisins skal ekki vera meiri en 20 Nm.

Niðurstöðurnar sem notaðar eru til að afla þessara gilda skulu koma úr upphaflega högginu við kólfinn en ekki úr stöðvunarfasanum. Kerfi sem notað er til að stöðva höggbúnaðinn eða kólfinn skal vera uppsett þannig að stöðvunarfassin skarist ekki í tíma við upphaflega höggið. Stöðvunarkerfið skal ekki verða þess valdandi að merkin frá nemunum fari yfir mörkin sem tilgreind eru fyrir sveifluvíddarflokkinn.

- 3.2.2. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 180 fyrir alla nema. Svörunargildin fyrir sveifluvíddarflokkinn eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skulu vera 10 kN fyrir kraftnema og 1000 Nm fyrir mælingarnar á beygjukraftvæginu.

3.3. *Framkvæmd prófunar*

- 3.3.1. Höggbúnaðurinn skal festur við knúnings- og stýrikerfið með lið sem takmarkar snúningsátak. Liðnum sem takmarkar snúningsátakið skal komið þannig fyrir að lengdarás fremri hlutans standi hornrétt á ás stýrikerfisins með $\pm 2^\circ$ fráviki og núningsvægi liðarins stillt á 650 Nm að lágmarki. Stýrikerfið skal útbúið með brautum með litla núningsmótstöðu sem gera höggbúnaðinum kleift að ferðast eingöngu í tilgreinda höggstefnu þegar það snertir kólfinn.

- 3.3.2. Massi höggbúnaðarins skal stilltur þannig að hann verði $12 \pm 0,1$ kg og tekur það til þeirra hluta knúnings- og stýrikerfisins sem eru áfastir höggbúnaðinum þegar höggið verður.

- 3.3.3. Þyngdarmiðja þeirra hluta höggbúnaðarins sem eru framan við liðinn sem takmarkar snúningsátakið, þ.m.t. öll áfest lóð, skal vera á miðlinu langsniðs höggbúnaðarins með ± 10 mm fráviki.

- 3.3.4. Frauðið á höggbúnaðinum skal ekki hafa verið notað áður þegar hann er vottaður.

- 3.3.5. Frauðið sem notað er á höggbúnaðinn skal ekki meðhöndlað eða aflagað of mikið fyrir eða eftir áfestingu eða meðan á henni stendur.

- 3.3.6. Höggbúnaðurinn með fremri hlutann í lóðrétti stöðu skal knúinn af stað lárétt á $7,1 \pm 0,1$ m/s hraða á kyrrstæðan kólf eins og sýnt er á mynd 6.

- 3.3.7. Massi kólfrörsins skal vera $3 \pm 0,03$ kg, utanmál þess 150 ± 14 mm og veggþykkt þess $3 \pm 0,15$ mm. Heildarlengd kólfrörsins skal vera 275 ± 25 mm. Kólfrörið skal vera úr kaldfáguðu, heildregnu stáli (yfirborðshúðun málsins er leyfileg til að vernda gegn tæringu) og vera þakið yfirborðsefni sem er þykkara en 2,0 míkrometrar. Það skal hengt úr tveimur vírum sem eru $1,5 \pm 0,2$ mm í þvermál og a.m.k. 2,0 metrar að lengd. Yfirborð kólfsins skal vera hreint og þurrt. Kólfrörið skal staðsett þannig að lengdarás sívalningsins standi hornrétt á fremri hlutann (þ.e. láréttur) með $\pm 2^\circ$ fráviki og í stefnu höggbúnaðarins með $\pm 2^\circ$ fráviki og að miðja kólfrörsins standi hornrétt á miðju fremri hluta höggbúnaðarins með ± 5 mm fráviki til hliðanna og ± 5 mm fráviki lóðrétt.

4. **Höggbúnaður sem er höfuðlíkan**

- 4.1. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns, barns/smávaxinnar fullorðinnar manneskju og fullorðinnar manneskju skal uppfylla kröfurnar sem tilgreindar eru í lið 4.2 þegar hann er prófaður eins og tilgreint er í lið 4.3.

Stöðugt hitastig höggbúnaðarins skal vera $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ meðan á vottuninni stendur.

4.2. *Kröfur*

- 4.2.1. Þegar höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns verður fyrir höggi frá vottunarhöggbúnaði sem er stýrt línulega eins og tilgreint er í lið 4.3 skal hámarkshröðunin sem einn þríása (eða þrír einása) hröðunarmælir mælir í höfuðlíkaninu ekki vera minni en 405 g og ekki meiri en 495 g. Hröðunartímaferillinn sem mælist skal hafa einn boga.
- 4.2.2. Þegar höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan barns/smávoxinnar fullorðinnar manneskju verður fyrir höggi frá vottunarhöggbúnaði sem er stýrt línulega eins og tilgreint er í lið 4.3 skal hámarkshröðunin sem einn þríása (eða þrír einása) hröðunarmælir mælir í höfuðlíkaninu ekki vera minni en 290 g og ekki meiri en 350 g. Hröðunartímaferillinn sem mælist skal hafa einn boga.
- 4.2.3. Þegar höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju verður fyrir höggi frá vottunarhöggbúnaði sem er stýrt línulega eins og tilgreint er í lið 4.3 skal hámarkshröðunin sem einn þríása (eða þrír einása) hröðunarmælir mælir í höfuðlíkaninu ekki vera minni en 337,5 g og ekki meiri en 412,5 g. Hröðunartímaferillinn sem mælist skal hafa einn boga.
- 4.2.4. Svörunargildi tækjabúnaðarins fyrir rásartíðniflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 1000. Svörunargildið fyrir sveifluvíddarflokkinn, eins og hann er skilgreindur í ISO-staðli 6487:2000 skal vera 1000 g fyrir hröðunina.

4.3. *Framkvæmd prófunar*

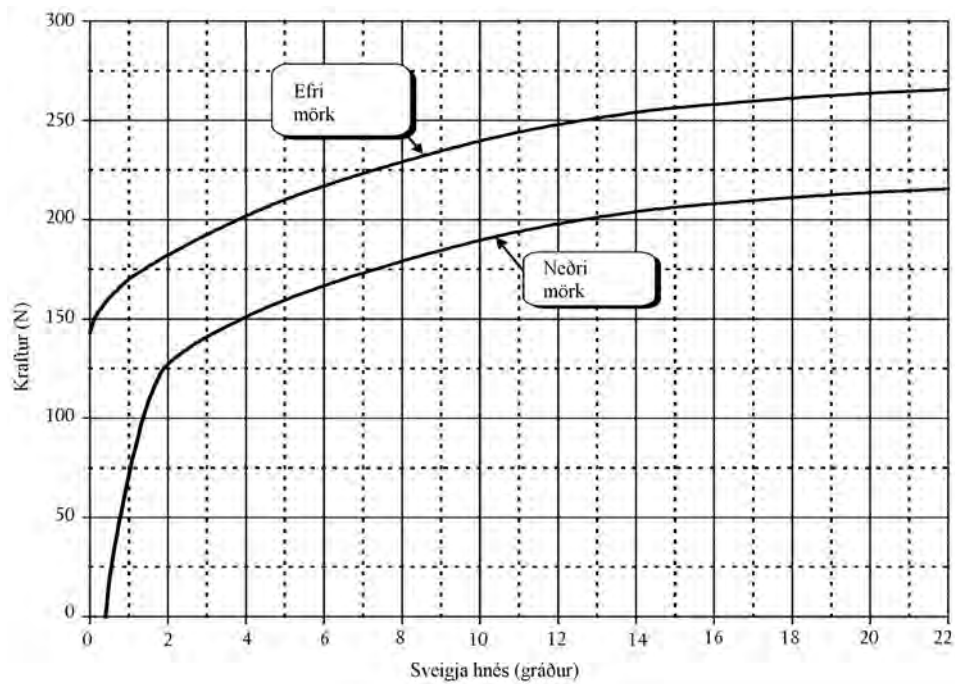
- 4.3.1. Höfuðlíkónin skulu hanga eins og sýnt er á mynd 7. Höggbúnaðurinn sem er höfuðlíkan skal hanga þannig að aftari hliðin myndi horn við lárétta línu sem er milli 25° og 90° eins og sýnt er á mynd 7.
- 4.3.2. Massi vottunarhöggbúnaðarins skal vera $1,0 \pm 0,01$ kg og tekur það til þeirra hluta knúnings- og stýrikerfisins sem eru áfastir höggbúnaðinum þegar höggið verður. Línulega stýrikerfið skal útbúið með brautum með litla núningsmótstöðu sem innihalda enga hluti sem snúast. Þvermál flötu hliðar höggbúnaðarins skal vera 70 ± 1 mm og skal brúnin rúnnuð með $5 \pm 0,5$ mm geisla. Framhlið vottunarhöggbúnaðarins skal vera úr áli og vera þakið yfirboðsefni sem er þykkara en 2,0 míkrometrar.
- 4.3.3. Vottunarhöggbúnaðurinn skal knúinn af stað lárétt á $7,0 \pm 0,1$ m/s hraða á kyrrstæðan höggbúnað sem er höfuðlíkan barns og barns/smávoxinnar fullorðinnar manneskju og á $10,0 \pm 0,1$ m/s hraða á kyrrstæðan höggbúnað sem er höfuðlíkan fullorðinnar manneskju. Vottunarhöggbúnaðurinn skal staðsettur þannig að þyngdarmiðja höggbúnaðarins sem er höfuðlíkan sé á miðlínu vottunarhöggbúnaðarins með ± 5 mm fráviki til hliðanna og ± 5 mm fráviki lóðrétt.
- 4.3.4. Prófunin skal framkvæmd á þremur mismunandi höggstöðum á hverjum höggbúnaði sem er höfuðlíkan. Á þessum tilteknu svæðum skal nota skaddaða húðklæðningu og/eða húðklæðningu sem hefur verið notuð áður.

Tafla 1: samantekt svörunarkrafna sem gerðar eru til höggbúnaðar sem er höfuðlíkan

Gerð höggbúnaðar og massi	Vottunarhraði [m/s]	Neðri mörk [g]	Efri mörk [g]
Barn 2,5 kg	7	405	495
Barn/smávoxin fullorðin manneskja 3,5 kg	7	290	350
Fullorðin manneskja 4,8 kg	10	337,5	412,5

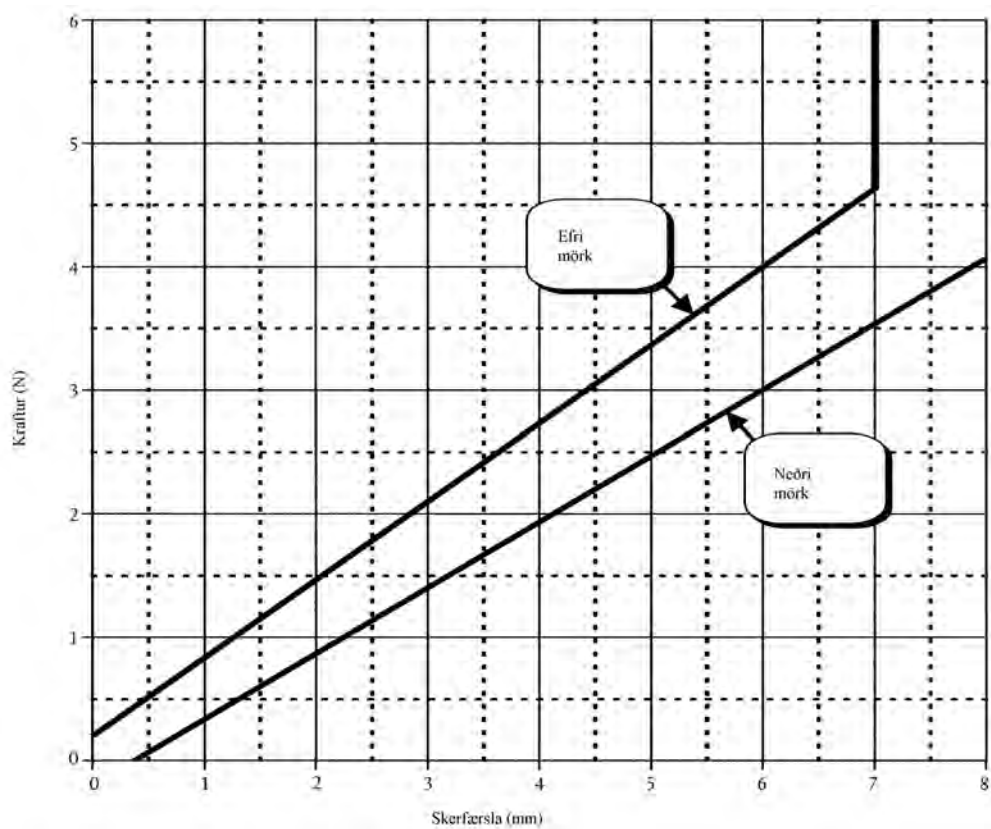
Mynd 1

Kröfur um kraft á móti stærð horns í kyrrstöðuvottunarprófun á sveigju höggbúnaðar sem er prófunarfótleggur



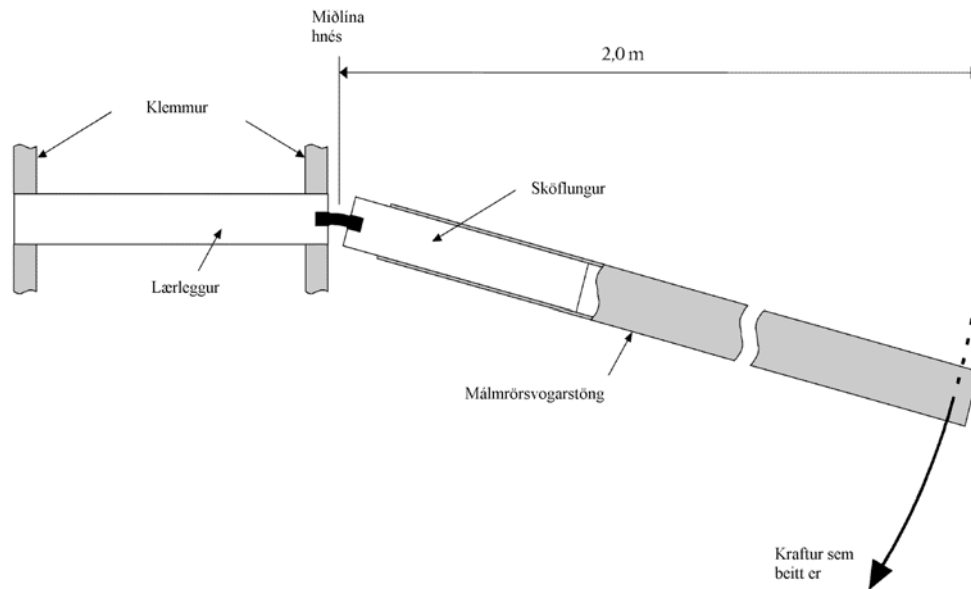
Mynd 2

Krafa um kraft á móti skerfærslu í kyrrstöðuvottunarprófun á skerfærslu höggbúnaðar sem er prófunarfótleggur



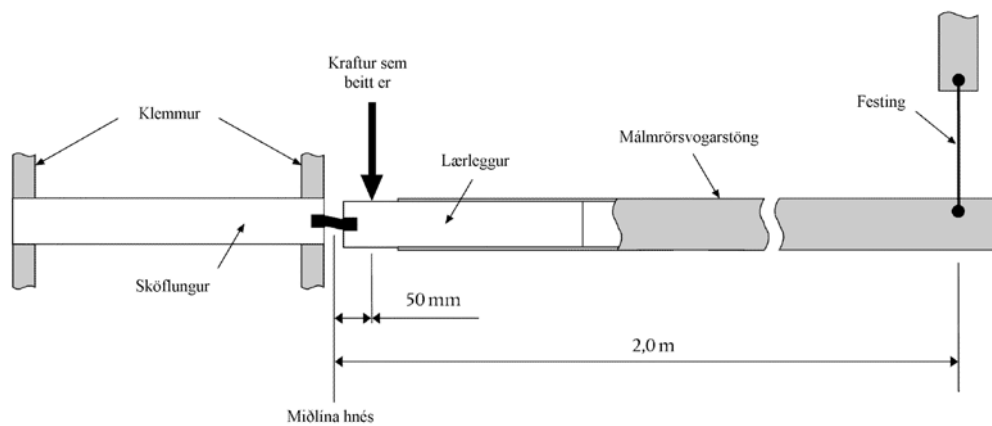
Mynd 3

Uppsetning kyrrstöðuvottunarprófunar á sveigju höggbúnaðar sem er prófunarfótleggur séð að ofan



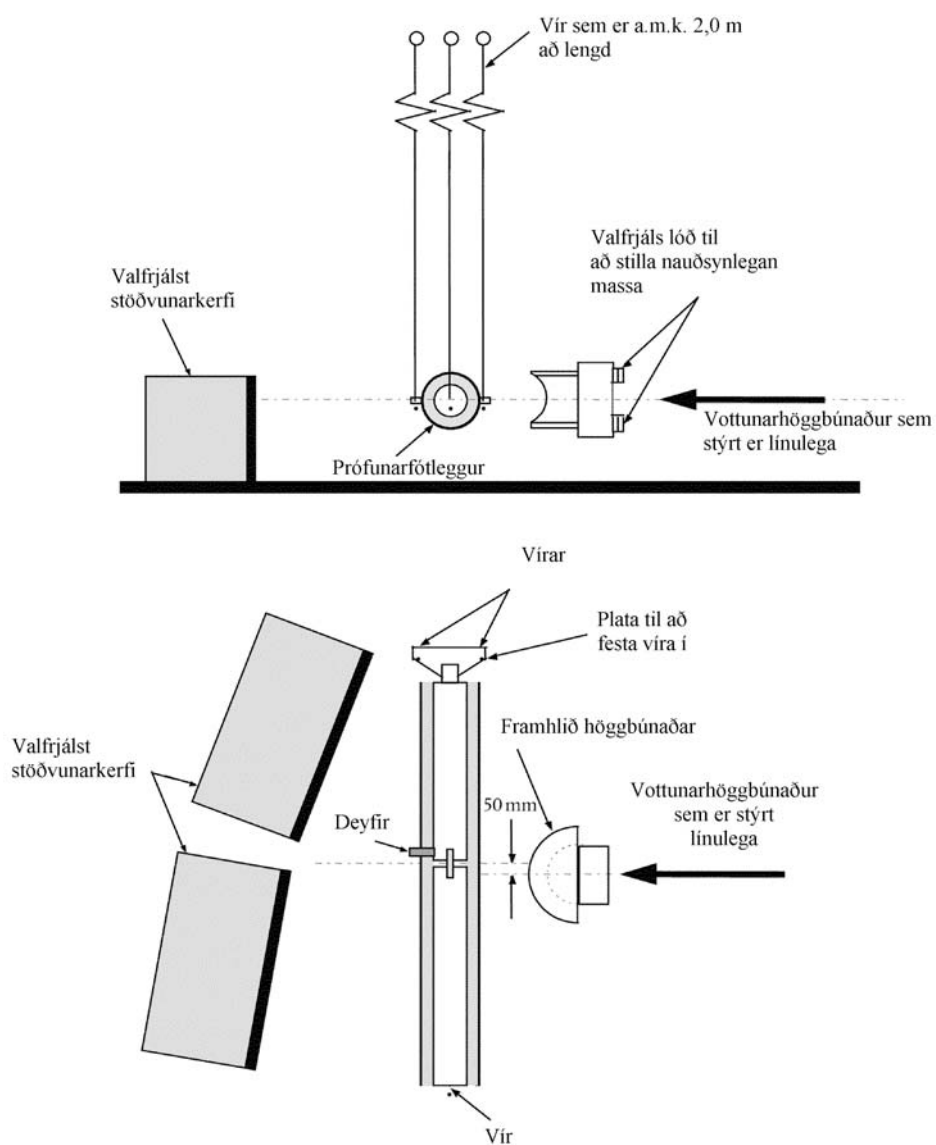
Mynd 4

Uppsetning kyrrstöðuvottunarprófunar á skerfærslu höggbúnaðar sem er prófunarfótleggur

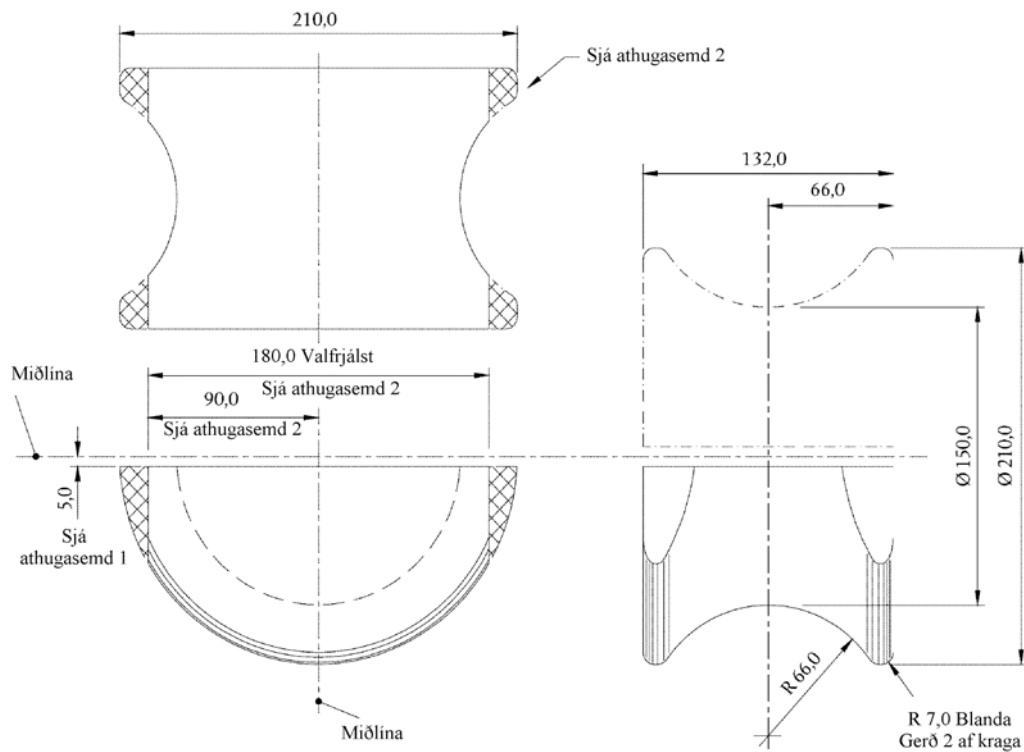


Mynd 5a

Uppsetning hreyfivottunarprófunar á höggbúnaði sem er prófunarfótleggur (efri myndin sýnir uppsetninguna frá hlið, neðri myndin sýnir uppsetninguna að ofan)



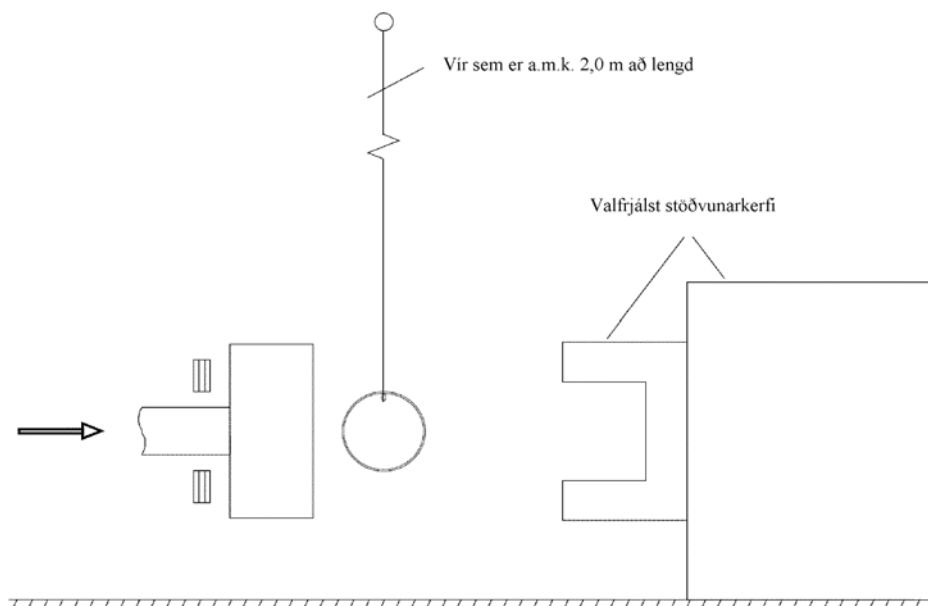
Mynd 5b

Nákvæmar upplýsingar um framhlið hreyfivottunarhöggbúnaðar fyrir prófunarfótlegg*Athugasemdir:*

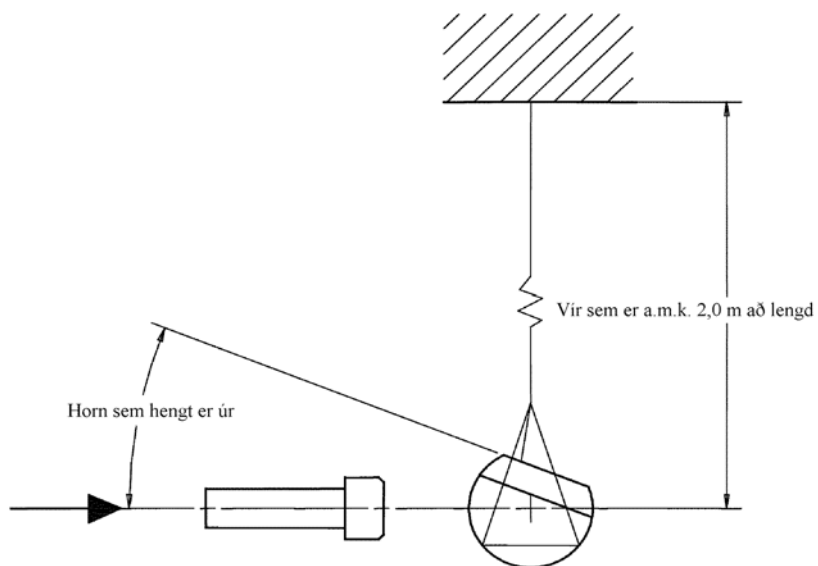
1. Sætið má framleiða sem eina heild og skera eins og sýnt er til að búa til tvo hluta.
2. Fjarlægja má skyggðu svæðin til að breyta löguninni eins og sýnt er.
3. Frávik allra stærða er $\pm 1,0$ mm.

Efni: álblanda

Mynd 6

Uppsetning hreyfivottunarprófunar á höggbúnaði sem er prófunarlærlegur

Mynd 7

Uppsetning hreyfivottunarprófunar á höggbúnaði sem er höfuðlíkan

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (EB) nr. 608/2004

2007/EES/54/05

frá 31. mars 2004

um merkingu matvæla og innihaldsefna matvæla með viðbættum jurtasterólum, jurtasterólestrum, jurtastanólum og/eða jurtastanólestrum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2000/13/EB frá 20. mars 2000 um samræmingu laga aðildarríkjanna um merkingu, kynningu og auglýsingu matvæla⁽¹⁾, eins og henni var breytt með tilskipun 2003/89/EB⁽²⁾, einkum 2. mgr. 4. gr. og 7. mgr. 6. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Jurtasteról, jurtasterólestrar, jurtastanól og jurtastanólestrar minnka kólesterólmagn í sermi en geta einnig minnkað β -karótín magn í blóðsermi. Aðildarríkin og framkvæmdastjórnin höfðu því samráð við vísindanefndina um matvæli (SCF) um áhrif þess að neyta jurtasteróla, jurtasterólestra, jurtastanóla og jurtastanólestra af margvíslegum toga.
- 2) Vísindanefndin um matvæli staðfesti í álitinu sínu frá 26. september 2002 um almennt yfirlit yfir langtímaáhrif aukinnar neyslu jurtasteróla úr ýmiss konar matvælum, með sérstakri áherslu á áhrif β -karótíns, að þörf væri á að merkja jurtasteról, jurtasterólestra, jurtastanól og jurtastanólestra eins og tilgreint er í ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2000/500/EB frá 24. júlí 2000 um að heimila að „gul smyrja með viðbættum jurtasterólestrum“ verði markaðssett sem ný matvæli eða ný innihaldsefni í matvælum samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 258/97⁽³⁾. Vísindanefndin um matvæli benti einnig á að engar vísbendingar væru um aukinn ávinning af inntöku af meira en 3 g á dag og að inntaka á stórum skömmtum gæti haft óæskileg áhrif og því væri skynsamlegt að forðast að inntakan verði meiri en 3 g af plöntusteróli á dag.
- 3) Framleiðsluvörur, sem innihalda jurtasteról eða jurtastanól, skulu boðnar til sölu sem stakir skammtar, sem innihalda annaðhvort að hámarki 3 g eða að hámarki 1 g af jurtasterólum eða jurtastanólum sem eru reiknuð sem óbundin jurtasteról eða jurtastanól. Þegar þetta á ekki við skal taka skýrt fram hvað telst vera eðlilegur skammtur matvæla, gefinn upp sem g eða ml, og magn jurtasteróls eða jurtastanóls, reiknað sem óbundin jurtasteról eða jurtastanól, í slíkum skammti. Samsetning og merking framleiðsluvara skal ætíð vera þannig að notendur geti auðveldlega

takmarkað neyslu á jurtasteróli eða jurtastanóli við 3 g á dag að hámarki með því að neyta annaðhvort eins skammts, sem inniheldur að hámarki 3 g, eða þriggja skammta sem innihalda 1 g að hámarki.

- 4) Til þess að auka skilning neytenda er rétt að orðið „plöntu-“ komi í stað orðsins „jurtu-“ á merki-miðanum.
- 5) Með ákvörðun 2000/500/EB var heimilt að bæta tilteknum jurtasterólestrum við gula smyrju. Í henni eru settar fram tilteknar kröfur um merkingar til að tryggja að framleiðsluvörurnar nái til markhópsins, nánar tiltekið til fólks sem vill minnka kólesterólmagnið í blóðinu.
- 6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um matvælaferli og heilbrigði dýra.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Þessi reglugerð gildir um matvæli og innihaldsefni matvæla með viðbættum jurtasterólum, jurtasterólestrum, jurtastanólum eða jurtastanólestrum.

2. gr.

Að því er varðar merkingu skulu jurtasteról, jurtasterolestri, jurtastanól og jurtastanolestri táknuð með hugtökunum „plöntusteról“, „plöntusterolestri“, „plöntustanól“ og „plöntustanolestri“ eða fleirtölumynd þeirra eftir því sem við á.

Með fyrirvara um aðrar kröfur í lögum Bandalagsins eða landslögum varðandi merkingar matvæla, skal í merkingu matvæla eða innihaldsefna matvæla með viðbættum jurtasterólum, jurtasterólestrum, jurtastanólum eða jurtastanólestrum koma fram eftirfarandi:

1. Í næstu nánd við söluheiti framleiðsluvörunnar skulu vera, auðsjáanleg og læsileg, orðin: „með viðbættu plöntusteróli eða plöntustanóli“.
2. Magn viðbættis jurtasteróls, jurtasterólestra, jurtastanóls eða jurtastanólestra (gefið upp sem % eða sem g af óbundnum plöntusterólum eða plöntustanólum á 100 g eða 100 ml af matvælunum) skal koma fram í skránni yfir innihaldsefni.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 97, 1.4.2004, bls. 44. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 163/2004 frá 3. desember 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 5.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L 109, 6.5.2000, bls. 29.

⁽²⁾ Stjtið. EB L 308, 25.11.2003, bls. 15.

⁽³⁾ Stjtið. EB L 200, 8.8.2000, bls. 59.

3. Þar skal vera yfirlýsing um að framleiðsluvaran sé einungis fyrir fólk sem vill minnka kólesterólmagn í blóði.
4. Þar skal vera yfirlýsing um að sjúklingar, sem taka lyf til að minnka kólesteról, skuli einungis neyta vörunnar undir eftirliti læknis.
5. Þar skal vera auðsjáanleg og læsileg yfirlýsing um að framleiðsluvaran sé í næringarfræðilegu tilliti ef til vill ekki heppileg fyrir þungaðar konur eða konur með börn á brjósti og börn yngri en fimm ára.
6. Þar skal gefið það ráð að framleiðsluvaran skuli vera hluti af rétt samsettu og fjölbreyttu mataræði sem felst m.a. í reglulegri neyslu ávaxta og grænmetis til að viðhalda karótenóíðmagni.
7. Á sama svæði og um getur í 3. lið hér að framan skal vera yfirlýsing um að forðast skuli neyslu meira en 3 g af viðbættum plöntusterólum eða plöntustanolum á dag.

8. Þar skal vera skilgreining á skammti viðkomandi matvæla eða innihaldsefna matvælna (helst í g eða ml) ásamt yfirlýsingu um magn plöntusteróls eða plöntustanóls í hverjum skammti.

3. gr.

Matvæli og innihaldsefni matvæla með viðbættum jurstanólestrum, sem eru komin á markað í Bandalaginu, eða hvers kyns „gul smyrja með viðbættum jurtasterólestrem“, sem voru leyfð með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2000/500/EB og eru framleidd sex mánuðum eftir gildistöku þessarar reglugerðar, skulu vera í samræmi við ákvæði 2. gr. um merkingu.

4. gr.

Reglugerð þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 31. mars 2004.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

ÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

2007/EES/54/06

frá 29. apríl 2004

um breytingu á ákvörðunum 97/830/EB, 2000/49/EB, 2002/79/EB og 2002/80/EB að því er varðar þá komustaði þar sem einungis má flytja viðkomandi vörur inn í Bandalagið (*)

(tilkynnt með númeri C(2004) 1594)

(2004/429/EB)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 93/43/EBE frá 14. júní 1993 um hollustuhætti í matvælaíðnaði ⁽¹⁾, einkum 1. mgr. 10. gr.,

með hliðsjón af aðildarsáttmála Tékklands, Eistlands, Kýpur, Lettlands, Litháens, Ungverjalands, Möltu, Póllands, Slóveníu og Slóvakíu, einkum 3. mgr. 2. gr.,

með hliðsjón af lögum um aðild Tékklands, Eistlands, Kýpur, Lettlands, Litháens, Ungverjalands, Möltu, Póllands, Slóveníu og Slóvakíu, einkum 2. mgr. 57. gr.,

að höfðu samráði við aðildarríkin,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í 2. viðauka ákvörðunar framkvæmdastjórnarinnar 97/830/EB frá 11. desember 1997 um niðurfellingu á ákvörðun 97/613/EB og setningu sérstakra skilyrða vegna innflutnings á pistasíuhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr pistasíuhnetum, sem eru upprunnar í Íran ⁽²⁾, eru skráðir þeir komustaðir þar sem aðeins er heimilt að flytja inn í Bandalagið sendingar af pistasíuhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr þeim, sem eru upprunnar í Íran ⁽²⁾ eða sendar þaðan.

2) Í II. viðauka ákvörðunar framkvæmdastjórnarinnar 2000/49/EB frá 6. desember 1999 um niðurfellingu á ákvörðun 1999/356/EB og setningu sérstakra skilyrða vegna innflutnings á jarðhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr jarðhnetum, sem eru upprunnar í Egyptalandi eða sendar þaðan ⁽³⁾, eru skráðir þeir komustaðir þar sem aðeins er heimilt að flytja inn í Bandalagið sendingar af jarðhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr þeim, sem eru upprunnar í Egyptalandi ⁽⁴⁾ eða sendar þaðan

3) Í II. viðauka ákvörðunar framkvæmdastjórnarinnar 2002/79/EB frá 4. febrúar 2002 um setningu sérstakra skilyrða vegna innflutnings á jarðhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr jarðhnetum, sem eru upprunnar í Kína⁽⁴⁾, eru skráðir þeir komustaðir þar sem aðeins er heimilt að flytja inn í Bandalagið sendingar af jarðhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr þeim, sem eru upprunnar í Kína eða sendar þaðan

4) Í II. viðauka ákvörðunar framkvæmdastjórnarinnar 2002/80/EB frá 4. febrúar 2002 um setningu sérstakra skilyrða vegna innflutnings á fíkjum, heslihnetum og pistasíuhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr þeim, sem eru upprunnar í Tyrklandi ⁽⁵⁾, eru skráðir þeir komustaðir þar sem aðeins er heimilt að flytja inn í Bandalagið sendingar af fíkjum, heslihnetum og pistasíuhnetum og tilteknum afurðum, unnum úr þeim, sem eru upprunnar í Tyrklandi eða sendar þaðan.

5) Aðlaga verður skrána yfir komustaði á grundvelli aðildar Tékklands, Eistlands, Kýpur, Lettlands, Litháens, Ungverjalands, Möltu, Póllands, Slóveníu og Slóvakíu að Sambandinu.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 154, 30.4.2004, bls. 20. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 163/2004, 3. desember 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 5.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L175, 19.7.1993, bls.1. Síðast breytt með reglugerð nr. 1882 (Stjtið. ESB L284, 31.10.2003, bls.1).

⁽²⁾ Stjtið. EB L343, 13.12.1997, bls.30. Síðast breytt með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2003/551/EC (Stjtið. ESB L187, 26.7.2003, bls.43).

⁽³⁾ Stjtið. EB L19, 25.1.2000, bls.46. Breytt með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2003/580/EC (Stjtið. ESB L197, 05.08.2003, bls.43).

⁽⁴⁾ Stjtið. EB L L34, 5.2.2002, bls.21. Síðast breytt með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2003/550/EB (Stjtið. ESB L187, 26.7.2003, bls.39).

⁽⁵⁾ Stjtið. EB L34, 5.2.2002, bls.26. Síðast breytt með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2003/552/EB (Stjtið. ESB L187, 26.7.2003, bls.47).

6) Nauðsynlegt er að uppfæra skrána yfir komustaði fyrir Þýskaland, Breska konungsríkið, Lúxemborg og Svíþjóð, þar sem heimilt er að flytja inn vörurnar, sem ákvarðanir 97/830/EB, 2000/49/EB, 2002/79/EB og 2002/80/EB fjalla um.

4. gr.

Í stað II. viðauka við ákvörðun 2002/80/EB komi textinn í IV. viðauka við þessa ákvörðun.

7) Því ber að breyta ákvörðunum 97/830/EB, 2000/49/EB, 2002/79/EB og 2002/80/EB til samræmis við það.

5. gr.

Ákvörðun þessi gildir frá 1. maí 2004. Aðildarríkin skulu gera nauðsynlegar ráðstafanir til að fara að ákvörðun þessari. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Í stað II. viðauka við ákvörðun 97/830/EB komi textinn í I. viðauka við þessa ákvörðun.

6. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

2. gr.

Í stað II. viðauka við ákvörðun 2000/49/EB komi textinn í II. viðauka við þessa ákvörðun.

Gjört í Brussel 29. apríl 2004.

3. gr.

Í stað II. viðauka við ákvörðun 2002/79/EB komi textinn í III. viðauka við þessa ákvörðun.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

I. VIDAUKI

„II. VIDAUKI

Skrá yfir komustaði þar sem heimilt er að flytja inn í Bandalagið pistasíuhnetur og tiltekna afurðir, unnar úr þeim, sem eru upprunnar í Íran eða sendar þaðan

Aðildarríki	Komustaður
Belgía	Antwerpen, Zeebrugge, Brussel/Bruxelles, Aalst
Tékkland	Celní úrad Praha D5
Danmörk	Allar danskar hafnir og flugvöllir
Þýskaland	HZA Lörrach-ZA Weil am Rhein-Autobahn, HZA Stuttgart- ZA Flughafen, HZA München - ZA München - Flughafen, Bezirksamt Reinickendorf von Berlin, Abteilung Finanzen, Wirtschaft und Kultur, Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt, Grenzkontrollstelle, HZA Frankfurt (Oder) - ZA Autobahn, HZA Cottbus- ZA Forst-Autobahn, HZA Bremen- ZA Neustädter Hafen, HZA Bremen - ZA Bremerhaven, HZA Hamburg-Hafen-ZA Waltershof, HZA Hamburg-Stadt, HZA Itzehoe-ZA Hamburg-Flughafen, HZA Frankfurt-am-Main-Flughafen, HZA Braunschweig-Abfertigungsstelle, HZA Hannover Hamburger Allee, HZA Koblenz – ZA Hahn-Flughafen, HZA Oldenburg-ZA Wilhelmshaven, HZA Bielefeld - ZA Eckendorfer Straße Bielefeld, HZA Erfurt - ZA Eisenach, HZA Potsdam - ZA Ludwigsfelde, HZA Potsdam - ZA Berlin-Flughafen Schönefeld, HZA Augsburg - ZA Memmingen, HZA Ulm - ZA Ulm (Donautal), HZA Karlsruhe - ZA Karlsruhe, HZA Berlin - ZA Dreilinden, HZA Gießen- ZA Gießen, HZA Gießen - ZA Marburg, HZA Singen – ZA Bahnhof, HZA Lörrach - ZA Weil am Rhein – Schusterinsel, HZA Hamburg-Stadt –ZA Oberelbe, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Billbrook, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Großmarkt, HZA Potsdam – ZA Berlin – Flughafen Schönefeld, HZA Düsseldorf – ZA Düsseldorf Nord
Eistland	Muuga höfn BIP Paljassaare höfn BIP, Paldiski-Lõuna höfn BIP, Dirhami höfn BIP, Luhamaa vegur BIP, Narva vegur BIP
Grikkland:	Athina, Pireas, Elefsis, Aerodromio ton Athinon, Thessaloniki, Volos, Patra, Iraklion tis Kritis, Aerodromio tis Kritis, Euzoni, Idomeni, Ormenio, Kipi, Kakavia, Niki, Promahonas, Pithio, Igoumenitsa, Kristalopigi
Spánn	Algeciras (höfn), Alicante (flugvöllur, höfn), Almeria (flugvöllur, höfn), Asturias (flugvöllur), Barcelona (flugvöllur, höfn, járnbraut), Bilbao (flugvöllur, höfn), Cadiz (höfn), Cartagena (höfn), Castellon (höfn), Ceuta (höfn), Gijón (höfn), Huelva (höfn), Irun (vegur), La Coruña (höfn), La Junquera (vegur) Las Palmas de Gran Canaria (flugvöllur, höfn), Madrid (flugvöllur, járnbraut), Malaga (flugvöllur, höfn), Marin (höfn), Melilla (höfn), Murcia (járnbraut), Palma de Mallorca (flugvöllur, höfn), Pasajes (höfn), San Sebastián (flugvöllur), Santa Cruz de Tenerife (höfn), Santander (flugvöllur, höfn), Santiago de Compostela (flugvöllur), Sevilla (flugvöllur, höfn), Tarragona (höfn), Tenerife Norte (flugvöllur), Tenerife Sur (flugvöllur), Valencia (flugvöllur, höfn), Vigo (flugvöllur, höfn), Villagarcia (höfn), Vitoria (flugvöllur), Zaragoza (flugvöllur)
Frakkland	Marseille (Bouches-du-Rhone), Le Havre (Seine-Maritime), Rungis MIN (Val-de-Marne), Lyon Chassieu CRD (Rhône), Strasbourg CRD (Bas-Rhin), Lille CRD (Nord), Saint-Nazaire Montoir CRD (Loire-Atlantique), Agen (Lot-et-Garonne), Port de la Pointe des Galets à la Réunion
Írland	Dublin — höfn og flugvöllur, Cork — höfn og flugvöllur, Shannon — flugvöllur
Ítalía	Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Ancona Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Bari Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Genova Ufficio Sanità Marittima di Livorno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Napoli Ufficio Sanità Marittima di Ravenna Ufficio Sanità Marittima di Salerno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Trieste Dogana di Ferneti-Interporto Monrupino (Trieste) Ufficio di Sanità Marittima di La Spezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Venezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Reggio Calabria

Aðildarríki	Komustaður
Kýpur	Límassol (höfn), Larnaca (flugvöllur)
Lettland	Grebneva, - vegur til Rússlands Terehova – vegur til Rússlands Pätarnieki – vegur til Hvítarússlands Silene – vegur til Hvítarússlands Daugavpils - vöruafgreiðslustöð við járnbraut Rēzekne – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Liepāja – höfn við sjó Ventspils – höfn við sjó Rīga – höfn við sjó Rīga - flugvöllur Rīga - pósthús
Litháen	Vegur: Kybartai, Lavoriškės, Medininkai, Panemunė, Šalčininkai. Flugvöllur: Vilnius Höfn við sjó: Malkū įlankos, Molo, Pilies. Járnbraut: Kena, Kybartai, Pagėgiai
Lúxemborg	Centre Douanier, Croix de Gasperich, Luxembourg Administration des Douanes et Accises, Bureau Luxembourg-Aéroport, Niederanven 6
Ungverjaland	Ferihegy – Budapest - flugvöllur Záhony - Szabolcs-Szatmár-Bereg - vegur Eperjeske - Szabolcs-Szatmár-Bereg - vegur Nagylak – Csongrád - vegur Lökösháza – Békés - járnbraut Röszke – Csongrád - vegur Kelebia - Bács-Kiskun - járnbraut Letenye – Zala - vegur Gyékényes – Somogy - járnbraut Mohács – Baranya - höfn
Malta	Malta Freeport, the Malta International Airport og Grand Harbour.
Holland	Allar hafnir, flugvellir og landamæraströðvar
Austurríki	HZA Feldkirch, HZA Graz, Nickelsdorf, Spielfeld, HZA Wien, ZA Wels, ZA Kledering, ZA Flughafen Wien, HZA Salzburg, ZA Klingenbach/Zweigstelle Sopron, ZA Karawankentunnel, ZA Villach
Pólland	Bezledy - Warmińskie – Mazurskie - landamæraströð við veg Kuznica Białostocka - Podlaskie - landamæraströð við veg Bobrowniki - Podlaskie - landamæraströð við veg Koroszczyn - Lubelskie - landamæraströð við veg Dorohusk - Lubelskie - landamæraströð við veg og járnbraut Gdynia – Pomorskie – landamæraströð við höfn við sjó Gdańsk - Pomorskie -landamæraströð við höfn við sjó Medyka-Przemyśl – Podkarpackie – landamæraströð við járnbraut Medyka - Podkarpackie - landamæraströð við veg Korczowa - Podkarpackie -landamæraströð við veg Jasionka – Podkarpackie – landamæraströð við flugvöll Szczecin - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Świnoujście - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Kołobrzeg - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó
Portúgal	Lisboa, Leixões
Slóvenía	Obrežje - landamæraströð við veg Koper – landamæraströð við höfn Dobova - landamæraströð við járnbraut
Slóvakía	Vyšné Nemecké – vegur, Čierna nad Tisou –. járnbraut
Finnland	Allar finnskar tollstöðvar

Aðildarríki	Komustaður
Svíþjóð	Göteborg, Stockholm, Helsingborg, Landvetter, Arlanda, Norrköping
Breska konungsríkið	Belfast, Dover, Felixstowe, Gatwick Airport, Goole, Grimsby, Harwich, Heathrow Airport, Hull, Immingham, Ipswich, Leith, Liverpool, London (þ.m.t. Tilbury, Thamesport og Sheerness), Manchester Airport, Manchester Containerbase, Manchester International Freight Terminal, Manchester (þ.m.t. Ellesmere Port), Middlesbrough, Southampton.”

II. VIDAUKI

„II. VIDAUKI

Skrá yfir komustaði þar sem heimilt er að flytja inn í Bandalagið jarðhnetur og afurðir, unnar úr þeim, sem eru upprunnar í Egyptalandi eða sendar þaðan

Aðildarríki	Komustaður
Belgía	Antwerpen, Zeebrugge, Brussel/Bruxelles, Aalst
Tékkland	Celní úřad Praha D5
Danmörk	Allar danskar hafnir og flugvællir
Þýskaland	HZA Lörrach-ZA Weil am Rhein-Autobahn, HZA Stuttgart- ZA Flughafen, HZA München - ZA München - Flughafen, Bezirksamt Reinickendorf von Berlin, Abteilung Finanzen, Wirtschaft und Kultur, Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt, Grenzkontrollstelle, HZA Frankfurt (Oder) - ZA Autobahn, HZA Cottbus- ZA Forst-Autobahn, HZA Bremen- ZA Neustädter Hafen, HZA Bremen - ZA Bremerhaven, HZA Hamburg-Hafen-ZA Waltershof, HZA Hamburg-Stadt, HZA Itzehoe-ZA Hamburg-Flughafen, HZA Frankfurt-am-Main-Flughafen, HZA Braunschweig-Abfertigungsstelle, HZA Hannover Hamburger Allee, HZA Koblenz – ZA Hahn-Flughafen, HZA Oldenburg-ZA Wilhelmshaven, HZA Bielefeld - ZA Eckendorfer Straße Bielefeld, HZA Erfurt - ZA Eisenach, HZA Potsdam - ZA Ludwigsfelde, HZA Potsdam - ZA Berlin-Flughafen Schönefeld, HZA Augsburg - ZA Memmingen, HZA Ulm -ZA Ulm (Donautal), HZA Karlsruhe - ZA Karlsruhe, HZA Berlin - ZA Dreilinden, HZA Gießen- ZA Gießen, HZA Gießen - ZA Marburg, HZA Singen –ZA Bahnhof, HZA Lörrach - ZA Weil am Rhein – Schusterinsel, HZA Hamburg-Stadt –ZA Oberelbe, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Billbrook, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Großmarkt, HZA Potsdam – ZA Berlin – Flughafen Schönefeld, HZA Düsseldorf – ZA Düsseldorf Nord
Eistland	Muuga höfn BIP Paljassaare höfn BIP, Paldiski-Lõuna höfn BIP, Dirhami höfn BIP, Luhamaa vegur BIP, Narva vegur BIP
Grikkland:	Athina, Pireas, Elefsis, Aerodromio ton Athinon, Thessaloniki, Volos, Patra, Iraklion tis Kritis, Aerodromio tis Kritis, Euzoni, Idomeni, Ormenio, Kipi, Kakavia, Niki, Promahonas, Pithio, Igoumenitsa, Kristalopigi
Spánn	Algeciras (höfn), Alicante (flugvöllur, höfn), Almeria (flugvöllur, höfn), Asturias (flugvöllur), Barcelona (flugvöllur, höfn, járnbraut), Bilbao (flugvöllur, höfn), Cadiz (höfn), Cartagena (höfn), Castellon (höfn), Ceuta (höfn), Gijón (höfn), Huelva (höfn), Irun (vegur), La Coruña (höfn), La Junquera (vegur) Las Palmas de Gran Canaria (flugvöllur, höfn), Madrid (flugvöllur, járnbraut), Malaga (flugvöllur, höfn), Marin (höfn), Melilla (höfn), Murcia (járnbraut), Palma de Mallorca (flugvöllur, höfn), Pasajes (höfn), San Sebastián (flugvöllur), Santa Cruz de Tenerife (höfn), Santander (flugvöllur, höfn), Santiago de Compostela (flugvöllur), Sevilla (flugvöllur, höfn), Tarragona (höfn), Tenerife Norte (flugvöllur), Tenerife Sur (flugvöllur), Valencia (flugvöllur, höfn), Vigo (flugvöllur, höfn), Villagarcia (höfn), Vitoria (flugvöllur), Zaragoza (flugvöllur)
Frakkland	Marseille (Bouches-du-Rhone), Le Havre (Seine-Maritime), Rungis MIN (Val-de-Marne), Lyon Chassieu CRD (Rhône), Strasbourg CRD (Bas-Rhin), Lille CRD (Nord), Saint-Nazaire Montoir CRD (Loire-Atlantique), Agen (Lot-et-Garonne), Port de la Pointe des Galets à la Réunion
Írland	Dublin - höfn og flugvöllur, Cork - höfn og flugvöllur, Shannon - flugvöllur
Ítalía	Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Ancona Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Bari Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Genova Ufficio Sanità Marittima di Livorno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Napoli Ufficio Sanità Marittima di Ravenna Ufficio Sanità Marittima di Salerno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Trieste Dogana di Ferneti-Interporto Monrupino (Trieste) Ufficio di Sanità Marittima di La Spezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Venezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Reggio Calabria

Aðildarríki	Komustaður
Kýpur	Limassol (höfn), Larnaca (flugvöllur)
Lettland	Grebneva, - vegur til Rússlands Terehova – vegur til Rússlands Pātarnieki – vegur til Hvítarússlands Silene – vegur til Hvítarússlands Daugavpils – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Rēzekne – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Liepāja – höfn við sjó Ventspils – höfn við sjó Rīga - höfn við sjó Rīga - flugvöllur Rīga – pósthús
Litháen	Vegur: Kybartai, Lavoriškės, Medininkai, Panemunė, Šalčininkai. Flugvöllur: Vilnius. Höfn við sjó: Malkū įlankos, Molo, Pilies. Járnbraut: Kena, Kybartai, Pagėgiai
Lúxemborg	Centre Douanier, Croix de Gasperich, Luxembourg Administration des Douanes et Accises, Bureau Luxembourg-Aéroport, Niederanven 9
Ungverjaland	Ferihegy – Budapest - flugvöllur Záhony - Szabolcs-Szatmár-Bereg - vegur Eperjeske - Szabolcs-Szatmár-Bereg - járnbraut Nagylak – Csongrád - vegur Lökösháza – Békés - járnbraut Röszke – Csongrád - vegur Kelebia - Bács-Kiskun - járnbraut Letenye – Zala - vegur Gyékényes – Somogy - járnbraut Mohács – Baranya - höfn
Malta	Malta Freeport, the Malta International Airport og Grand Harbour.
Holland	Allar hafnir, flugvellir og landamæraströðvar
Austurríki	HZA Feldkirch, HZA Graz, Nickelsdorf, Spielfeld, HZA Wien, ZA Wels, ZA Kledering, ZA Flughafen Wien, HZA Salzburg, ZA Klingenbach/Zweigstelle Sopron, ZA Karawankentunnel, ZA Villach
Pólland	Bezledy - Warmińsko – Mazurskie - landamæraströð við veg Kuźnica Białostocka - Podlaskie - landamæraströð við veg Bobrowniki - Podlaskie - landamæraströð við veg Koroszczyn - Lubelskie - landamæraströð við veg Dorohusk - Lubelskie - landamæraströð við veg og járnbraut Gdynia - Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Gdańsk - Pomorskie -landamæraströð við höfn við sjó Medyka-Przemyśl - Podkarpackie - landamæraströð við járnbraut Medyka - Podkarpackie - landamæraströð við veg Korczowa - Podkarpackie - landamæraströð við veg Jasionka - Podkarpackie - landamæraströð við flugvöll Szczecin - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Świnoujście - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Kołobrzeg - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó
Portúgal	Lisboa, Leixões
Slóvenía	Obrežje - landamæraströð við veg Koper - landamæraströð við höfn Dobova - landamæraströð við járnbraut
Slóvakía	Vyšné Nemecké – vegur, Čierna nad Tisou – járnbraut
Finnland	Allar finnskar tollstöðvar

Aðildarríki	Komustaður
Svíþjóð	Göteborg, Stockholm, Helsingborg, Landvetter, Arlanda, Norrköping
Breska konungsríkið	Belfast, Dover, Felixstowe, Gatwick Airport, Goole, Grimsby, Harwich, Heathrow Airport, Hull, Immingham, Ipswich, Leith, Liverpool, London (þ.m.t. Tilbury, Thamesport og Sheerness), Manchester Airport, Manchester Containerbase, Manchester International Freight Terminal, Manchester (þ.m.t. Ellesmere Port), Middlesbrough, Southampton.”

III. VIDAUKI

„II. VIDAUKI

Skrá yfir komustaði þar sem heimilt er að flytja inn í Bandalagið jarðhnetur og tilteknar afurðir, unnar úr þeim, sem eru upprunnar í Kína eða sendar þaðan

Aðildarríki	Komustaður
Belgía	Antwerpen, Zeebrugge, Brussel/Bruxelles, Aalst
Tékkland	Celní úrad Praha D5
Danmörk	Allar danskar hafnir og flugvællir
Þýskaland	HZA Lörrach-ZA Weil am Rhein-Autobahn, HZA Stuttgart- ZA Flughafen, HZA München - ZA München - Flughafen, Bezirksamt Reinickendorf von Berlin, Abteilung Finanzen, Wirtschaft und Kultur, Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt, Grenzkontrollstelle, HZA Frankfurt (Oder) - ZA Autobahn, HZA Cottbus- ZA Forst-Autobahn, HZA Bremen- ZA Neustädter Hafen, HZA Bremen - ZA Bremerhaven, HZA Hamburg-Hafen-ZA Waltershof, HZA Hamburg-Stadt, HZA Itzehoe-ZA Hamburg-Flughafen, HZA Frankfurt-am-Main- Flughafen, HZA Braunschweig-Abfertigungsstelle, HZA Hannover Hamburger Allee, HZA Koblenz – ZA Hahn-Flughafen, HZA Oldenburg-ZA Wilhelmshaven, HZA Bielefeld - ZA Eckendorfer Straße Bielefeld, HZA Erfurt - ZA Eisenach, HZA Potsdam - ZA Ludwigsfelde, HZA Potsdam - ZA Berlin-Flughafen Schönefeld, HZA Augsburg - ZA Memmingen, HZA Ulm - ZA Ulm (Donautal), HZA Karlsruhe - ZA Karlsruhe, HZA Berlin - ZA Dreilinden, HZA Gießen- ZA Gießen, HZA Gießen - ZA Marburg, HZA Singen – ZA Bahnhof, HZA Lörrach - ZA Weil am Rhein – Schusterinsel, HZA Hamburg-Stadt –ZA Oberelbe, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Billbrook, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Großmarkt, HZA Potsdam – ZA Berlin – Flughafen Schönefeld, HZA Düsseldorf – ZA Düsseldorf Nord
Eistland	Muuga höfn BIP Paljassaare höfn BIP, Paldiski-Lõuna höfn BIP, Dirhami höfn BIP, Luhamaa vegur BIP, Narva vegur BIP
Grikkland:	Athina, Pireas, Elefsis, Aerodromio ton Athinon, Thessaloniki, Volos, Patra, Iraklion tis Kritis, Aerodromio tis Kritis, Euzoni, Idomeni, Ormenio, Kipi, Kakavia, Niki, Promahonas, Pithio, Igoumenitsa, Kristalopigi
Spánn	Algeciras (höfn), Alicante (flugvöllur, höfn), Almeria (flugvöllur, höfn), Asturias (flugvöllur), Barcelona (flugvöllur, höfn, járnbraut), Bilbao (flugvöllur, höfn), Cadiz (höfn), Cartagena (höfn), Castellon (höfn), Ceuta (höfn), Gijón (höfn), Huelva (höfn), Irun (vegur), La Coruña (höfn), La Junquera (vegur) Las Palmas de Gran Canaria (flugvöllur, höfn), Madrid (flugvöllur, járnbraut), Malaga (flugvöllur, höfn), Marin (höfn), Melilla (höfn), Murcia (járnbraut), Palma de Mallorca (flugvöllur, höfn), Pasajes (höfn), San Sebastián (flugvöllur), Santa Cruz de Tenerife (höfn), Santander (flugvöllur, höfn), Santiago de Compostela (flugvöllur), Sevilla (flugvöllur, höfn), Tarragona (höfn), Tenerife Norte (flugvöllur), Tenerife Sur (flugvöllur), Valencia (flugvöllur, höfn), Vigo (flugvöllur, Höfn), Villagarcia (höfn), Vitoria (flugvöllur), Zaragoza (flugvöllur)
Frakkland	Marseille (Bouches-du-Rhone), Le Havre (Seine-Maritime), Rungis MIN (Val-de-Marne), Lyon Chassieu CRD (Rhône), Strasbourg CRD (Bas-Rhin), Lille CRD (Nord), Saint-Nazaire Montoir CRD (Loire-Atlantique), Agen (Lot-et-Garonne), Port de la Pointe des Galets à la Réunion
Írland	Dublin – höfn og flugvöllur, Cork – höfn og flugvöllur, Shannon – flugvöllur
Ítalía	Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Ancona Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Bari Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Genova Ufficio Sanità Marittima di Livorno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Napoli Ufficio Sanità Marittima di Ravenna Ufficio Sanità Marittima di Salerno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Trieste Dogana di Ferneti-Interporto Monrupino (Trieste) Ufficio di Sanità Marittima di La Spezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Venezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Reggio Calabria

Aðildarríki	Komustaður
Kýpur	Limassol (höfn), Larnaca (flugvöllur)
Lettland	Grebneva – vegur til Rússlands Terehova – vegur til Rússlands Pātarnieki – vegur til Hvítarússlands Silene – vegur til Hvítarússlands Daugavpils – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Rēzekne – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Liepāja – höfn við sjó Ventspils – höfn við sjó Rīga – höfn við sjó Rīga – flugvöllur Rīga – pósthús
Litháen	Vegur: Kybartai, Lavoriškės, Medininkai, Panemunė, Šalčininkai. Flugvöllur: Vilnius. Höfn við sjó: Malkū įlankos, Molo, Pilies. Járnbraut: Kena, Kybartai, Pagėgiai
Lúxemborg	Centre Douanier, Croix de Gasperich, Luxembourg Administration des Douanes et Accises, Bureau Luxembourg-Aéroport, Niederaanven 12
Ungverjaland	Ferihegy – Budapest - flugvöllur Záhony - Szabolcs-Szatmár-Bereg - vegur Eperjeske - Szabolcs-Szatmár-Bereg - járnbraut Nagylak – Csongrád - vegur Lökösháza – Békés - járnbraut Rőszke – Csongrád - vegur Kelebia - Bács-Kiskun - járnbraut Letenye – Zala - vegur Gyékényes – Somogy - járnbraut Mohács – Baranya - höfn
Malta	Malta Freeport, the Malta International Airport og Grand Harbour.
Holland	Allar hafnir, flugvellir og landamæra­stöðvar
Austurríki	HZA Feldkirch, HZA Graz, Nickelsdorf, Spielfeld, HZA Wien, ZA Wels, ZA Kledering, ZA Flughafen Wien, HZA Salzburg, ZA Klingenbach/Zweigstelle Sopron, ZA Karawankentunnel, ZA Villach
Pólland	Bezledy - Warmińsko – Mazurskie - landamæra­stöð við veg Kućnica Białostocka - Podlaskie - landamæra­stöð við veg Bobrowniki - Podlaskie - landamæra­stöð við veg Koroszczyn - Lubelskie - landamæra­stöð við veg Dorohusk - Lubelskie - landamæra­stöð við veg og járnbraut Gdynia - Pomorskie - landamæra­stöð við höfn við sjó Gdańsk - Pomorskie -landamæra­stöð við höfn við sjó Medyka-Przemyśl - Podkarpackie - landamæra­stöð við járnbraut Medyka - Podkarpackie - landamæra­stöð við veg Korczowa - Podkarpackie -landamæra­stöð við veg Jasionka - Podkarpackie – landamæra­stöð við flugvöll Szczecin - Zachodnio – Pomorskie - landamæra­stöð við höfn við sjó Świnoujście - Zachodnio – Pomorskie - landamæra­stöð við höfn við sjó Kołobrzeg - Zachodnio – Pomorskie - landamæra­stöð við höfn við sjó
Portúgal	Lisboa, Leixões
Slóvenía	Obrežje - landamæra­stöð við veg Koper - landamæra­stöð við höfn Dobova - landamæra­stöð við járnbraut
Slóvakía	Vyšné Nemecké – vegur, Čierna nad Tisou – járnbraut
Finnland	Allar finnskar tollstöðvar

Aðildarríki	Komustaður
Svíþjóð	Göteborg, Stockholm, Helsingborg, Landvetter, Arlanda, Norrköping
Breska konungsríkið	Belfast, Dover, Felixstowe, Gatwick Airport, Goole, Grimsby, Harwich, Heathrow Airport, Hull, Immingham, Ipswich, Leith, Liverpool, London (þ.m.t. Tilbury, Thamesport og Sheerness), Manchester Airport, Manchester Containerbase, Manchester International Freight Terminal, Manchester (þ.m.t. Ellesmere Port), Middlesbrough, Southampton.”

IV. VIDAUKI„II. VIDAUKI

Skrá yfir komustaði þar sem heimilt er að flytja inn í Bandalagið fíkjur, heslihnatur og pistasiúhnatur og tilteknar afurðir, unnar úr þeim, sem eru upprunnar í Tyrklandi eða sendar þaðan

Aðildarríki	Komustaður
Belgía	Antwerpen, Zeebrugge, Brussel/Bruxelles, Aalst
Czech Republic	Celní úřad Praha D5
Danmörk	Allar danskar hafnir og flugvöllir
Þýskaland	HZA Lörrach-ZA Weil am Rhein-Autobahn, HZA Stuttgart- ZA Flughafen, HZA München - ZA München - Flughafen, Bezirksamt Reinickendorf von Berlin, Abteilung Finanzen, Wirtschaft und Kultur, Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt, Grenzkontrollstelle, HZA Frankfurt (Oder) - ZA Autobahn, HZA Cottbus- ZA Forst-Autobahn, HZA Bremen- ZA Neustädter Hafen, HZA Bremen - ZA Bremerhaven, HZA Hamburg-Hafen-ZA Waltershof, HZA Hamburg-Stadt, HZA Itzehoe-ZA Hamburg-Flughafen, HZA Frankfurt-am-Main- Flughafen, HZA Braunschweig-Abfertigungsstelle, HZA Hannover Hamburger Allee, HZA Koblenz – ZA Hahn-Flughafen, HZA Oldenburg-ZA Wilhelmshaven, HZA Bielefeld - ZA Eckendorfer Straße Bielefeld, HZA Erfurt - ZA Eisenach, HZA Potsdam - ZA Ludwigsfelde, HZA Potsdam - ZA Berlin-Flughafen Schönefeld, HZA Augsburg - ZA Memmingen, HZA Ulm - ZA Ulm (Donautal), HZA Karlsruhe - ZA Karlsruhe, HZA Berlin - ZA Dreilinden, HZA Gießen- ZA Gießen, HZA Gießen - ZA Marburg, HZA Singen – ZA Bahnhof, HZA Lörrach - ZA Weil am Rhein – Schusterinsel, HZA Hamburg-Stadt –ZA Oberelbe, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Billbrook, HZA Hamburg-Stadt – ZA Oberelbe – Abfertigungsstelle Großmarkt, HZA Potsdam – ZA Berlin – Flughafen Schönefeld, HZA Düsseldorf – ZA Düsseldorf Nord
Eistland	Muuga höfn BIP Paljassaare höfn BIP, Paldiski-Lõuna höfn BIP, Dirhami höfn BIP, Luhamaa vegur BIP, Narva vegur BIP
Grikkland	Athina, Pireas, Elefsis, Aerodromio ton Athinon, Thessaloniki, Volos, Patra, Iraklion tis Kritis, Aerodromio tis Kritis, Euzoni, Idomeni, Ormenio, Kipi, Kakavia, Niki, Promahonas, Pithio, Igoumenitsa, Kristalopigi
Spánn	Algeciras (höfn), Alicante (flugvöllur, höfn), Almeria (flugvöllur, höfn), Asturias (flugvöllur), Barcelona (flugvöllur, höfn, járnbraut), Bilbao (flugvöllur, höfn), Cadiz (höfn), Cartagena (höfn), Castellon (höfn), Ceuta (höfn), Gijón (höfn), Huelva (höfn), Irun (vegur), La Coruña (höfn), La Junquera (vegur) Las Palmas de Gran Canaria (flugvöllur, höfn), Madrid (flugvöllur, járnbraut), Malaga (flugvöllur, höfn), Marin (höfn), Melilla (höfn), Murcia (járnbraut), Palma de Mallorca (flugvöllur, höfn), Pasajes (höfn), San Sebastián (flugvöllur), Santa Cruz de Tenerife (höfn), Santander (flugvöllur, höfn), Santiago de Compostela (flugvöllur), Sevilla (flugvöllur, höfn), Tarragona (höfn), Tenerife Norte (flugvöllur), Tenerife Sur (flugvöllur), Valencia (flugvöllur, höfn), Vigo (flugvöllur, höfn), Villagarcia (höfn), Vitoria (flugvöllur), Zaragoza (flugvöllur)
Frakkland	Marseille (Bouches-du-Rhone), Le Havre (Seine-Maritime), Rungis MIN (Val-de-Marne), Lyon Chassieu CRD (Rhône), Strasbourg CRD (Bas-Rhin), Lille CRD (Nord), Saint-Nazaire Montoir CRD (Loire-Atlantique), Agen (Lot-et-Garonne), Port de la Pointe des Galets à la Réunion
Írland	Dublin – höfn og flugvöllur, Cork – höfn og flugvöllur, Shannon — flugvöllur
Ítalía	Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Ancona Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Bari Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Genova Ufficio Sanità Marittima di Livorno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Napoli Ufficio Sanità Marittima di Ravenna Ufficio Sanità Marittima di Salerno Ufficio Sanità Marittima ed Aerea di Trieste Dogana di Ferneti-Interporto Monrupino (Trieste) Ufficio di Sanità Marittima di La Spezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Venezia Ufficio di Sanità Marittima e Aerea di Reggio Calabria

Aðildarríki	Komustaður
Kýpur	Limassol Port, Larnaca Airport
Lettland	Grebneva – vegur til Rússlands Terehova – vegur til Rússlands Pātarnieki – vegur til Hvítarússlands Silene – vegur til Hvítarússlands Daugavpils – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Rēzekne – vöruafgreiðslustöð við járnbraut Liepāja – höfn við sjó Ventspils – höfn við sjó Rīga – höfn við sjó Rīga – flugvöllur Rīga – pósthús
Litháen	Vegur: Kybartai, Lavoriškės, Medininkai, Panemunė, Šalčininkai Flugvöllur: Vilnius. Höfn við sjó: Malkū įlankos, Molo, Pilies. Járnbraut: Kena, Kybartai, Pagėgiai
Lúxemborg	Centre Douanier, Croix de Gasperich, Luxembourg Administration des Douanes et Accises, Bureau Luxembourg-Aéroport, Niederanven
Ungverjaland	Ferihegy – Budapest – flugvöllur Záhony - Szabolcs-Szatmár-Bereg – vegur Eperjeske - Szabolcs-Szatmár-Bereg – járnbraut Nagylak – Csongrád – vegur Lökösháza – Békés – járnbraut Rőszke – Csongrád – vegur Kelebia - Bács-Kiskun –járnbraut Letenye – Zala – vegur Gyékényes – Somogy – járnbraut Mohács – Baranya - höfn
Malta	Malta Freeport, the Malta International Airport og Grand Harbour.
Holland	Allar hafnir, flugvellir og landamæraströðvar
Austurríki	HZA Feldkirch, HZA Graz, Nickelsdorf, Spielfeld, HZA Wien, ZA Wels, ZA Kledering, ZA Flughafen Wien, HZA Salzburg, ZA Klingenbach/Zweigstelle Sopron, ZA Karawankentunnel, ZA Villach
Pólland	Bezledy - Warmińsko – Mazurskie - landamæraströð við veg Kuźnica Białostocka - Podlaskie - landamæraströð við veg Bobrowniki - Podlaskie - landamæraströð við veg Koroszczyn - Lubelskie - landamæraströð við veg Dorohusk - Lubelskie - landamæraströð við veg og járnbraut Gdynia - Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Gdańsk - Pomorskie -landamæraströð við höfn við sjó Medyka-Przemyśl - Podkarpackie - landamæraströð við járnbraut Medyka - Podkarpackie - landamæraströð við veg Korczowa - Podkarpackie -landamæraströð við veg Jasionka - Podkarpackie - landamæraströð við flugvöll Szczecin - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Świnoujście - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó Kołobrzeg - Zachodnio – Pomorskie - landamæraströð við höfn við sjó
Portúgal	Lisboa, Leixões
Slóvenía	Obrežje - landamæraströð við veg Koper - landamæraströð við höfn Dobova - landamæraströð við járnbraut
Slóvakía	Vyšné Nemecké – vegur, Čierna nad Tisou – járnbraut
Finnland	Allar finnskar tollstöðvar

Aðildarríki	Komustaður
Svíþjóð	Göteborg, Stockholm, Helsingborg, Landvetter, Arlanda, Norrköping
Breska konungsríkið	Belfast, Dover, Felixstowe, Gatwick Airport, Goole, Grimsby, Harwich, Heathrow Airport, Hull, Immingham, Ipswich, Leith, Liverpool, London (þ.m.t. Tilbury, Thamesport og Sheerness), Manchester Airport, Manchester Containerbase, Manchester International Freight Terminal, Manchester (þ.m.t. Ellesmere Port), Middlesbrough, Southampton.“

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 2004/77/EB

2007/EES/54/07

frá 29. apríl 2004

um breytingu á tilskipun 94/54/EB að því er varðar merkingu tiltekinna matvæla sem innihalda glýsyrrisínsýru og ammoníumsalt hennar (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2000/13/EB frá 20. mars 2000 um samræmingu laga aðildarríkanna um merkingu, kynningu og auglýsingu matvæla ⁽¹⁾, einkum 2. mgr. 4. gr.,

að höfðu samráði við vísindanefndina um matvæli,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 94/54/EB frá 18. nóvember 1994 um lögbundnar upplýsingar á merkingum tiltekinna matvæla, aðrar en þær sem kveðið er á um í tilskipun 2000/13/EB ⁽²⁾, er skrá yfir matvæli sem skulu merkt þannig að viðbótarupplýsingar komi þar fram.
- 2) Markmiðið með þessari tilskipun er að bæta við skrána tilteknum matvælum sem innihalda glýsyrrisínsýru og ammoníumsalt hennar.
- 3) Glýsyrrisínsýra er náttúrulegt efni sem finnst í lakkrísplöntunni *Glycyrrhiza glabra* en ammoníumsalt hennar er framleitt úr vatnskenndum, útdregnum kjarna lakkrísplöntunnar *Glycyrrhiza glabra*. Glýsyrrisínsýra og ammoníumsalt hennar eru tilgreind í skrá Bandalagsins yfir bragðefni, sem mælt er fyrir um í ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 1999/217/EB frá 23. febrúar 1999 um samþykkt skráar yfir bragðefni, sem eru notuð í eða á matvælum, til beitingar reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 2232/96 frá 28. október 1996 ⁽³⁾. Váhrif vegna neyslu glýsyrrisínsýru og ammoníumsalts hennar tengjast einkum lakkríssælgæti, einnig tryggigúmmi, jurtatei og annarri drykkjarvöru.
- 4) Í álitinu sínu frá 4. apríl 2003 um glýsyrrisínsýru og ammoníumsalt hennar komst vísindanefndin um matvæli að þeirri niðurstöðu að efri mörk reglugerðarinnar neyslu, sem er 100 mg á dag, veitti flestum nægilega vernd, en neysla yfir þessum

mörkum kann að valda háþrýstingi. Nefndin vakti þó athygli á því að þessi efri mörk kunna að veita tilteknum hópum manna ófullnægjandi vernd. Í þeim hópum eru einstaklingar sem þjást af röskuðu jafnvægi í salt- og vökvabúskap líkamans.

- 5) Þessar niðurstöður sýna að þörf er á merkingum sem veita neytandanum skýrar upplýsingar um hvort glýsyrrisínsýra eða ammoníumsalt hennar er í sælgæti og drykkjarvörum. Þegar mikið magn af glýsyrrisínsýru eða ammoníumsalti hennar er í þessum vörum skal fræða neytendur, einkum þá sem þjást af háþrýstingi, um að forðast skuli að neyta þeirra í miklu magni. Til að tryggja að neytendur skilji þessar upplýsingar sem best skal helst nota hugtakið „lakkrískjarni“ sem er vel þekkt.
- 6) Því ber að breyta tilskipun 94/54/EB til samræmis við þetta.
- 7) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um matvælaferli og heilbrigði dýra.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Ákvæðum viðaukans við tilskipun 94/54/EB er hér með breytt í samræmi við viðaukann við þessa tilskipun.

2. gr.

1. Aðildarríkin skulu heimila viðskipti með vörur, sem samræmast ákvæðum þessarar tilskipunar, eigi síðar en 20. maí 2005.

2. Aðildarríkin skulu banna viðskipti með vörur, sem samræmast ekki ákvæðum þessarar tilskipunar, frá og með 20. maí 2006.

Þó skal heimila viðskipti með vörur, sem uppfylla ekki ákvæði þessarar tilskipunar en voru merktar fyrir 20. maí 2006, á meðan birgðir endast.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 162,30.4.2004, bls. 76. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 163/2004, 3. desember 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 5.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L 109, 6.5.2000, bls. 29. Tilskipuninni var breytt með tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2003/89/EB frá 10. nóvember 2003 (Stjtið. ESB L 308, 25.11.2003, bls. 15).

⁽²⁾ Stjtið. EB L 300, 23.11.1994, bls. 14. Tilskipuninni var breytt með tilskipun ráðsins 96/21/EB (Stjtið. EB L 88, 5.4.1996, bls. 5).

⁽³⁾ Stjtið. EB L 84, 27.3.1999, bls. 1. Ákvörðuninni var breytt með ákvörðun 2002/113/EB (Stjtið. EB L 49, 20.2.2002, bls. 1).

3. gr.

1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 20. maí 2005. Þau skulu þegar í stað senda framkvæmdastjórninni texta þessara ákvæða og samsvörunartöflu milli viðkomandi ákvæða og þessarar tilskipunar.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessi ákvæði skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þau eru birt opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

2. Aðildarríkin skulu senda framkvæmdastjórninni helstu ákvæði úr landslögum sem þau samþykkja um málefni sem tilskipun þessi tekur til.

4. gr.

Tilskipun þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

5. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 29. apríl 2004.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

VIDAUKI

Eftirfarandi bætist við viðaukann við tilskipun 94/54/EB:

Tegund eða flokkur matvæla	Upplýsingar
Sælgæti eða drykkjarvörur sem innihalda glýsyrrisínsýru eða ammoníumsalt hennar sem stafar af viðbótarefni eða -efnum á borð við lakkrísplöntuna <i>Glycyrrhiza glabra</i> , að styrkleika 100 mg/kg eða 10 mg/l eða þar yfir.	Orðin „inniheldur lakkrís“ bætist við á eftir skránni yfir innihaldsefni, nema orðið „lakkrís“ sé nú þegar í skránni yfir innihaldsefni eða komi fyrir í söluheiti framleiðsluvörunnar. Ef skrá yfir innihaldsefni liggur ekki fyrir skulu upplýsingarnar koma fram nálægt söluheiti framleiðsluvörunnar.
Sælgæti sem inniheldur glýsyrrisínsýru eða ammoníumsalt hennar sem stafar af viðbótarefni eða -efnum á borð við lakkrísplöntuna <i>Glycyrrhiza glabra</i> , að styrkleika 4 g/kg eða þar yfir.	Eftirfarandi texta verður að bæta við á eftir skránni yfir innihaldsefni: „inniheldur lakkrís, einstaklingar með háþrýsting skulu forðast að neyta vörunnar í miklu magni“. Ef skrá yfir innihaldsefni liggur ekki fyrir skulu upplýsingarnar koma fram nálægt söluheiti framleiðsluvörunnar.
Drykkjarvörur sem innihalda glýsyrrisínsýru eða ammoníumsalt hennar sem stafar af viðbótarefni eða -efnum á borð við lakkrísplöntuna <i>Glycyrrhiza glabra</i> , að styrkleika 50 mg/l eða meira eða 300 mg/l eða meira ef um er að ræða drykkjarvörur með meira en 1,2% vínanda, miðað við rúmmál ⁽¹⁾ .	Eftirfarandi texta verður að bæta við á eftir skránni yfir innihaldsefni: „inniheldur lakkrís, einstaklingar með háþrýsting skulu forðast að neyta vörunnar í miklu magni“. Ef skrá yfir innihaldsefni liggur ekki fyrir skulu upplýsingarnar koma fram nálægt söluheiti framleiðsluvörunnar.

⁽¹⁾ Viðmiðunargildið á við um vörur sem eru tilbúnar til neyslu eða endurgerðar samkvæmt fyrirælum framleiðenda.

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 2004/73/EB

2007/EES/54/08

frá 29. apríl 2004

um tuttugustu og níundu aðlögun að tækniframförum á tilskipun ráðsins 67/548/EBE um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 67/548/EBE frá 27. júní 1967 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna ⁽¹⁾, einkum 28. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er skrá yfir hættuleg efni ásamt upplýsingum um flokkun og merkingu hvers efnis. Uppfæra þarf skrána til að bæta við fleiri tilkynntum, nýjum efnum og fleiri fyrirbyggjandi efnum og laga eldri færslur að tækniframförum, t.d. með því að setja styrkleikamörk fyrir tiltekin efni í umhverfinu. Einnig er nauðsynlegt að fella brott færslur fyrir tiltekin efni eða kljúfa sumar af færslunum þar eð flokkunin gildir ekki lengur fyrir öll efnin í viðkomandi færslu. Breyta þarf merkingu efna sem innihalda 1,3bútadíen svo að fram komi að það efni er flokkað sem stökkbreytivaldur í þessari tilskipun.

2) Í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er mælt fyrir um aðferðir til að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif efna og efnablandna. Rétt þykir að breyta þessum viðauka til að halda í lágmarki fjölda þeirra dýra sem eru notuð við tilraunir, í samræmi við tilskipun ráðsins 86/609/EBE frá 24. nóvember 1986 um samræmingu á ákvæðum í lögum og stjórnsýslufyrirmælum aðildarríkjanna um verndun dýra

sem notuð eru í tilrauna- og vísindaskyni ⁽²⁾. Þessu til samræmis skal endurskoða aðferðir, sem eru notaðar við ákvörðun á hálflangvinnum eiturhrifum við inntöku, í köflum B.1, B.4, B.5, B.31 og B.35. Enn fremur skal bæta kafla B.42 við V. viðauka þannig að fyrir liggi endurbætt aðferð til ákvörðunar á hálflangvinnum eiturhrifum við inntöku. Að lokum skal bæta við kafla A.21 um eðlisefnafræðilega eiginleika, kafla B.43 um hálflangvinn eiturhrif við inntöku og köflum C.21 til C.24 um eiturhrif í umhverfinu svo að ákvarða megi eiginleika sem aðrar aðferðir í V. viðauka ná ekki að gera full skil.

3) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit nefndar um aðlögun að tækniframförum á tilskipunum um að ryðja úr vegi tæknilegum hindrunum í viðskiptum með hættuleg efni og efnablöndur.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Eftirfarandi breytingar eru gerðar á tilskipun 67/548/EBE:

1. Ákvæðum I. viðauka er breytt sem hér segir:

a) í stað athugasemdar K í formálsorðunum komi textinn í 1. viðauka A,

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 152, 30.4.2004, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 163/2004 frá 3. desember 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 26, 26.5.2005, bls. 7.

⁽¹⁾ Stjtið. EB 196, 16.8.1967, bls. 1. Tilskipuninni var síðast breytt með reglugerð (EB) nr. 807/2003 (Stjtið. EB L 122, 16.5.2003, bls. 36).

⁽²⁾ Stjtið. EB L 358, 18.12.1986, bls. 1. Tilskipuninni var síðast breytt með tilskipun Evrópubingsins og ráðsins 2003/65/EB (Stjtið. EB L 230, 16.9.2003, bls. 32).

- b) í stað færslunnar, sem samsvara færslunum í 1. viðauka B við þessa tilskipun, komi textinn í þeim viðauka,
- c) færslurnar í I. viðauka C við þessa tilskipun eru felldar inn í samræmi við niðurröðun færslna í I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE,
- d) færslur með skrárnúmer 604-050-00-X, 607-050-00-8, 607-171-00-6 og 613-130-00-3 falli brott,
- e) í stað færslunnar með skrárnúmerinu 048-002-00-0 komi færslur með skrárnúmerunum 048-002-00-0 og 048-011-00-X sem birtar eru í I. viðauka D við þessa tilskipun,
- f) í stað færslunnar með skrárnúmerinu 609-006-00-3 komi færslur með skrárnúmerunum 609-006-00-3 og 609-065-00-5 sem birtar eru í I. viðauka D við þessa tilskipun,
- g) stað færslunnar með skrárnúmerinu 612-039-00-6 komi færslur með skrárnúmerunum 612-039-00-6 og 612-207-00-9 sem birtar eru í I. viðauka D.

2. Eftirfarandi breytingar eru gerðar á V. viðauka:

- a) textinn í 2. viðauka A við þessa tilskipun bætist við kafla A.21,
- b) í stað kafla B.1a komi textinn í 2. viðauka B við þessa tilskipun,
- c) í stað kafla B.1b komi textinn í 2. viðauka C við þessa tilskipun,
- d) í stað kafla B.4 komi textinn í 2. viðauka D við þessa tilskipun,
- e) í stað kafla B.5 komi textinn í 2. viðauka E við þessa tilskipun,
- f) í stað kafla B.31 komi textinn í 2. viðauka F við þessa tilskipun,
- g) í stað kafla B.35 komi textinn í 2. viðauka G við þessa tilskipun,

- h) textinn í 2. viðauka H við þessa tilskipun bætist við sem kaflar B.42 og B.43,
- i) textinn í 2. viðauka I við þessa tilskipun bætist við sem kaflar C.21 til C.24.

2. gr.

1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórn-sýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 31. október 2005. Þau skulu þegar í stað senda framkvæmdastjórninni texta þessara ákvæða og samsvörunartöflu milli viðkomandi ákvæða og þessarar tilskipunar. Þegar aðildarríkin samþykkja þessi ákvæði skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þau eru birt opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

2. Aðildarríkin skulu senda framkvæmdastjórninni helstu ákvæði úr landslögum sem þau samþykkja á því sviði sem tilskipun þessi nær til.

3. gr.

Tilskipun þessi öðlast gildi á tuttugasta degi frá því að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 29. apríl 2004.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Margot WALLSTRÖM

framkvæmdastjóri.

I. VIÐAUKI A

„Athugasemd K:

Ekki er nauðsynlegt að flokka efnið sem krabbameinsvald eða stökkbreytivald ef unnt er að sýna fram á að í því sé minna en 0,1% af 1,3-bútadíeni (EINECS-númer 203-450-8), miðað við þyngd. Ef efnið er ekki flokkað sem krabbameinsvaldur eða stökkbreytivaldur skal nota a.m.k. varnaðarsetningar (2-)9-16. Þessi athugasemd á við tiltekin, flókin efni í I. viðauka sem eru unnin úr olíu.“

2. VIÐAUKI A

„A.21. OXUNAREIGINLEIKAR (VÖKVAR)

1. AÐFERÐ

1.1 INNGANGUR

Þessi aðferð er ætluð til mælingar á getu fljótandi efnis til að auka brunahraða eða brunastyrk brennanlegs efnis eða getu þess til að mynda blöndu með brennanlegu efni sem sjálfkviknar þegar þessum tveimur efnum hefur verið blandað vandlega saman. Aðferðin byggist einkum á prófunaraðferð SP fyrir oxandi vökva (1. heimild) og er jafngild henni. Þar eð aðferðin A.21 er fyrst og fremst hönnuð til að fullnægja kröfum samkvæmt tilskipun 67/548/EEC er þó aðeins krafist samanburðar við eitt viðmiðunarefni. Það kann að vera nauðsynlegt að gera prófanir og samanburð með fleiri viðmiðunarefnum ef þess er að vænta að niðurstöðurnar verði notaðar í öðrum tilgangi ⁽¹⁾.

Ekki þarf að gera þessa prófun ef athugun á byggingarformúlu efnisins sýnir ótvírætt að það getur ekki hvarfast á útverminn hátt við brennanlegt efni.

Gagnlegt er að afla upplýsinga um hugsanlega sprengifimi efnisins áður en prófað er.

Þessi prófun hentar ekki fyrir föst efni, lofttegundir, sprengifim efni, mjög eldfim efni eða lífræn peroxíð.

Prófunin kann að vera óþörf ef þegar liggja fyrir niðurstöður fyrir prófunarefnið úr SP-prófuninni fyrir oxandi vökva (1. heimild).

1.2 SKILGREININGAR OG MÆLIEININGAR

Meðaltími þrýstingshækkunar er meðaltal mælinga á þeim tíma sem það tekur prófunarblönduna að valda þrýstingshækkun úr 690 kPa í 2 070 kPa yfir þrýstingi andrúmslofts.

1.3 VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefnið er 65% (massahlutfall) saltpéturssýra í vatnslausn (af greiningarhreinleika) ⁽²⁾.

Sjái rannsakandi fram á að niðurstöðurnar úr þessari prófun kunni að verða notaðar síðar í öðrum tilgangi¹ getur hann einnig prófað önnur viðmiðunarefni ⁽³⁾.

1.4 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Prófunarvökvanum er blandað saman við trefjótt beðmi í massahlutfallinu 1:1 og settur í þrýstihylki. Verði sjálfkvikun við blöndun eða áfyllingu er frekari prófun ónauðsynleg.

Verði ekki sjálfkvikun er prófunin framkvæmd til fulls. Blandan er hituð í þrýstihylki og meðaltíminn, sem það tekur þrýstinginn að hækka úr 690 kPa í 2 070 kPa yfir þrýstingi andrúmslofts, er ákvarðaður. Niðurstöðurnar eru bornar saman við meðaltíma þrýstingshækkunar fyrir blöndu af viðmiðunarefninu eða efnunum og beðmi í hlutfallinu 1:1.

⁽¹⁾ Eins og t.d. innan ramma flutningareglugerða SP.

⁽²⁾ Títur skal sýruna fyrir prófun til að staðfesta styrk hennar.

⁽³⁾ Í 1. riti í heimildaskrá er t.d. notað 50% (massahlutfall) perklórsýra og 40% (massahlutfall) natríumklórat.

1.5 GÆÐAVIDMIÐANIR

Niðurstöður úr fimm tilraunum í röð á einu efni mega ekki víkja meira en 30% frá reiknuðu meðaltali. Niðurstöður, sem víkja meira en 30% frá meðaltalinu, skulu ekki notaðar, síðan skal bæta aðferðina, sem er notuð við blöndun og áfyllingu, og endurtaka tilraunina.

1.6 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1 Undirbúningur

1.6.1.1 Brennanlegt efni

Þurrkað, trefjótt beðmi með trefjum, sem eru 50 til 250 μm að lengd og 25 μm að meðalþvermáli ⁽⁴⁾, er notað sem brennanlegt efni. Það er þurrkað þar til það hefur náð stöðugri þyngd í lagi, sem er ekki yfir 25 mm að þykkt, við 105 °C í 4 klukkustundir og geymt í þurrkara með rakadrægu efni þar til það hefur kólnað og þörf er á að nota það. Vatnsmagnið í þurrkaða beðminu á að vera minna en 0,5% miðað við þurrmassa ⁽⁵⁾. Ef þörf krefur skal framlengja þurrkunartímann til að þetta náist ⁽⁶⁾. Nota skal sömu framleiðslulotu beðmis í allri prófuninni.

1.6.1.2 Tækjabúnaður

1.6.1.2.1 Þrýstihylki

Við prófunina er notað þrýstihylki. Hylkið er sívalt þrýstihylki úr stáli, 89 mm að lengd og 60 mm að ytra þvermáli (sjá 1. mynd). Tvær gagnstæðar hliðar á þrýstihylkinu eru sorfnar flatar (þannig að þversnið þrýstihylkisins minnkar í 50 mm) til að auðveldara verði að halda hylkinu föstu á meðan kveikjutappanum og loftunartappanum er komið fyrir. Í báðum endum þrýstihylkisins, sem er með 20 mm borvídd, hefur borviddin verið aukið fyrstu 19 mm og snittað fyrir 1" rör samkvæmt breskum staðli (BSP) eða sömu stærð samkvæmt metrakerfinu. Þrýstiventill í formi hliðargreinar er skrúfaður í ávalt yfirborð þrýstihylkisins í 35 mm fjarlægð frá öðrum endanum og myndar 90° horn við sorfnu fletina. Borað er 12 mm gat fyrir þrýstiventilinn og það snittað fyrir 1/2" skrúfgang samkvæmt breskum staðli á enda hliðargreinarinnar (eða sömu stærð samkvæmt metrakerfinu). Ef þörf krefur er þétti úr hvarftregu efni komið fyrir til að tryggja að ekki komi til gasleka. Hliðargreinin nær 55 mm út fyrir bol þrýstihylkisins og er með borviddina 6 mm. Í enda hliðargreinarinnar er borviddin aukið og snittað fyrir þrýstiskynjara með himnu. Nota má hvers konar þrýstingsmælíbúnað svo fremi heitar lofttegundir eða niðurbrotsafurðir hafi ekki áhrif á hann og hann geti svarað þrýstingsshækkun úr 690 í 2 070 kPa á 5 ms eða styttri tíma.

Þeim enda þrýstihylkisins, sem er fjær hliðargreininni, er lokað með kveikjutappa sem er með tveimur rafskautum og er annað skautið einangrað frá meginhluta tappans en hitt jarðtengt við hann. Hinum enda þrýstihylkisins er lokað með öryggisskífú sem brestur við u.þ.b. 2 200 kPa þrýsting og er haldið fastri með götuðum tappa (retaining plug) með 20 mm borvídd. Ef þörf krefur er notað þétti úr hvarftregu efni með kveikjutappanum til að tryggja að ekki komi til gasleka. Standur (2. mynd) heldur samstæðunni í rétttri stöðu á meðan hún er í notkun. Standurinn er venjulega plata úr mjúku stáli, 235 mm × 184 mm × 6 mm, og 185 mm langur ferstrendur hólkur sem er 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Úr öðrum enda hólksins eru skornar burt tvær gagnstæðar hliðar þannig að úr verði form á tveimur flötum fótum í beinu framhaldi af 86 mm löngum óskornum kassa. Endarnir á þessum flötu fótum eru skornir þannig að fætunir myndi 60° horn við láréttan flöt og þeir eru síðan soðnir við plötuna. Rauf, sem er 22 mm breið og 46 mm djúp, er sorfin í efri hluta kassans á annarri fótahliðinni svo að hliðargreinin falli í raufina þegar þrýstihylkissamstæðunni er komið fyrir í kassahluta standsins þannig að kveikjutappinn snúi niður. Stálbútur, sem er 30 mm breiður og 6 mm á þykkt, er soðinn við neðra, innra borð kassans og gegnir hlutverki millistykks. Tvær 7 mm þumalskrúfur eru skrúfaðar í hinum megin frá til að halda þrýstihylkinu kirfilega föstu. Tvær 12 mm breiðar ræmur úr 6 mm þykku stáli, sem eru soðnar á flötu fætterna við neðri enda kassans, bera þrýstihylkið uppi.

⁽⁴⁾ t.d. Whatmans-beðmiduft fyrir súlskiljun CF 11, verðlistanr. 4021 050.

⁽⁵⁾ Staðfest t.d. með Karls-Fishers-títrun.

⁽⁶⁾ Þessu vatnshlutfalli er einnig hægt að ná (t.d.) með hitun við 105 °C í loftæmi í 24 klst.

1.6.1.2.2 *Kveikjakerfi*

Kveikjakerfið er 25 cm langur vír úr Ni/Cr sem er 0,6 mm í þvermál og með viðnámið 3,85 ohm/m. Vírinn er undinn í spólu utan um tein, sem er 5 mm að þvermáli, og festur við rafskaut kveikjutappans. Útfærsla rafspólunnar skal vera önnur þeirra sem sýndar eru á 3. mynd. Fjarlægðin frá botni hylkisins að neðri brún rafspólunnar skal vera 20 mm. Ef rafskautin eru ekki stillanleg skal einangra endana á kveikjuvírnum milli rafspólunnar og botns þrýstihylkisins með keramikslíðri. Vírinn er hitaður með aflgjafa sem getur gefið stöðugan straum sem er a.m.k. 10 A.

1.6.2 **Framkvæmd prófunarinnar ⁽⁷⁾**

Tækjabúnaðinum, fullsamsettum með þrýstiskynjara og hitunarkerfi á sínum stað en án öryggisskífur, er komið fyrir á standinum þannig að endinn með kveikjutappanum snúi niður. Í bikarglasi úr gleri er 2,5 g af prófunarvökvanum og 2,5 g af þurrkuðu beðmi blandað saman með hræripinna úr gleri ⁽⁸⁾. Til öryggis er rétt að hafa öryggishlíf milli þess sem blandar og blöndunnar á meðan blöndun fer fram. Ef kviknar í blöndunni við blöndun eða áfyllingu er ekki þörf á frekari prófunum. Blöndunni er hellt í smáum skömmtum með því að banka létt í þrýstihylkið og þess gætt að hún umljúki rafspóluna og sé í góðri snertingu við hana. Mikilvægt er að rafspólan aflagist ekki við bankið því að það gæti leitt til þess að niðurstöðurnar yrðu rangar ⁽⁹⁾. Öryggisskífunni er komið fyrir og gataði tappinn skrúfaður fast á. Áfyllta hylkinu er komið fyrir þannig að öryggisskífan snúi upp á kveikjustandinum sem á að vera í hentugum, brynvörðum dragskáp eða kveikihólfi. Aflgjafinn er tengdur við ytri skaut kveikjutappans og 10 A straumi er hleypt á. Ekki má líða lengri tími en 10 mínútur frá því að blöndun hefst og þar til straumi er hleypt á.

Merkið, sem þrýstiskynjarinn gefur, er skráð í viðeigandi kerfi sem gerir kleift bæði að meta sambandið milli tíma og þrýstings og skrá það varanlega (t.d. má nota gagnaskráningarkerfi sem er tengt við sírita). Blandan er hituð upp þar til öryggisskífan brestur eða þar til liðnar eru a.m.k. 60 sek. Bresti öryggisskífan ekki skal blandan látin kólna og síðan skal tækjabúnaðurinn tekinn varlega í sundur og skal gæta varúðar vegna hugsanlegs yfirþrýstings. Gerðar eru fimm tilraunir með prófunarefninu og viðmiðunarefninu eða -efnunum. Skráður er tíminn sem það tekur þrýstinginn að hækka úr 690 kPa í 2 070 kPa yfir loftþrýsting. Reiknaður er meðaltími þrýstingshækkunar.

Í sumum tilvikum geta efnin framkallað (of mikla eða of litla) þrýstingshækkun sem stafar af efnahvörfum og tengist ekki oxunareiginleikum efnisins. Þegar svo er kann að reynast nauðsynlegt að endurtaka prófunina með hvarftregu efni, t.d. díatómíti (kísilgúr), í stað beðmisins til að fá skýrari mynd af eðli hvarfanna.

2. **GÖGN**

Þrýstingshækkunartíminn fyrir bæði prófunarefnið og viðmiðunarefnið eða -efnin.

Þrýstingshækkunartíminn fyrir prófanirnar með hvarftregu efni ef þær fara fram.

2.1 **ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA**

Reiknaður er meðaltími þrýstingshækkunar fyrir bæði prófunarefnið og viðmiðunarefnið eða -efnin.

Reiknaður er meðaltími þrýstingshækkunar fyrir prófanirnar með hvarftregu efni (ef þær fara fram).

⁽⁷⁾ Farið skal með blöndur oxara og beðmis eins og þær geti verið sprengifimar og meðhöndla þær með tilhlýðilegri varúð.

⁽⁸⁾ Í raun er hægt að gera þetta með því að útbúa blöndu prófunarvökva og beðmis í hlutföllunum 1:1 í meira magni en þarf fyrir tilraunina og færa $5 \pm 0,1$ g yfir í þrýstihylkið. Blandan verður að vera nýlögðu fyrir hverja tilraun.

⁽⁹⁾ Einkum verður að koma í veg fyrir snertingu milli aðliggjandi snúninga á rafspólunni.

Í töflu 1 eru sýnd nokkur dæmi um niðurstöður.

Tafla 1

Dæmi um niðurstöður ^(d)

Efni ^(c)	Meðaltími þrýstingshækkunar fyrir 1: 1 blöndu með beðmi (ms)
Ammoníumdíkrómat, mettuð vatnslausn	20 800
Kalsíumnítrat, mettuð vatnslausn	6 700
Járn(III)nítrat, mettuð vatnslausn	4 133
Lítíumperklórat, mettuð vatnslausn	1 686
Magnesiumperklórat, mettuð vatnslausn	777
Nikkelnítrat, mettuð vatnslausn	6 250
Saltpéturssýra, 65%	4 767 ^(a)
Perklórsýra, 50%	121 ^(a)
Perklórsýra, 55%	59
Kalíumnítrat (saltpétur), 30% vatnslausn	26 690
Silfurnítrat, mettuð vatnslausn	— ^(b)
Natríumklórat, 40% vatnslausn	2 555 ^(a)
Natríumnítrat (sílesaltpétur), 45% vatnslausn	4 133
<i>Hvarfíregt efni</i>	
Vatn:beðmi	— ^(b)

^(a) Meðalgildi úr samanburðarrannsóknnum mismunandi rannsóknarstofa.

^(b) Ekki náðist hámarksþrýstingurinn 2 070 kPa.

^(c) Mettaðar lausnir skulu búnar til við 20 °C.

^(d) Sjá 1. rit í heimildarskrá um flokkun skv. flutningakerfi SP.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Prófunarskýrslan skal innihalda upplýsingar um eftirfarandi:

- tegund prófunarefnis, samsetningu, hreinleika o.s.frv.,
- styrk prófunarefnisins,
- aðferð sem er notuð við þurrkun beðmisins,
- vatnsinnihald beðmisins sem er notað,
- niðurstöður mælinga,
- niðurstöður úr prófunum með hvarftregu efni ef slíkar prófanir fóru fram,
- reiknaður meðaltími þrýstingshækkunar,
- frávík frá þessari aðferð og ástæður þeirra,
- allar aðrar upplýsingar eða athugasemdir sem hafa þýðingu fyrir túlkun niðurstaðna.

3.2 TÚLKUN NIÐURSTAÐNA ⁽¹⁰⁾

Prófunarniðurstöður eru metnar með hliðsjón af:

- a) því hvort sjálfsíkvikun verður í prófunarefnis- og beðmisblöndunni og
- b) samanburði við meðaltíma þrýstingshækkunar úr 690 kPa í 2 070 kPa hjá viðmiðunarefninu eða -efnunum.

Fljótandi efni telst vera oxari ef

- a) sjálfsíkvikun verður í blöndu efnisins og sellulósa í massahlutfallinu 1:1 eða
- b) blanda efnisins og beðmis í massahlutfallinu 1:1 sýnir meðalþrýstingshækkunartíma sem er minni en eða jafn meðalþrýstingshækkunartíma fyrir blöndu af 65% (massahlutfall) saltpéturssýru í vatnslausn og beðmis í massahlutfallinu 1:1.

Ef þörf krefur skal, til að komast hjá falsjákvæðum niðurstöðum, við túlkun niðurstaðna einnig skoða niðurstöðurnar sem fengust við prófun efnisins með hvarftregu efni.

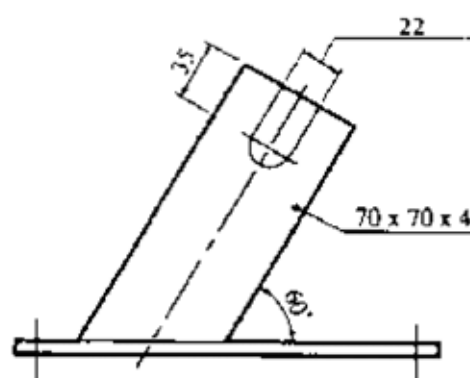
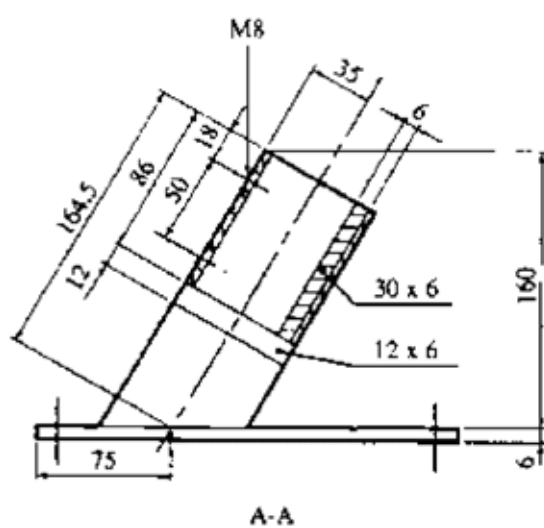
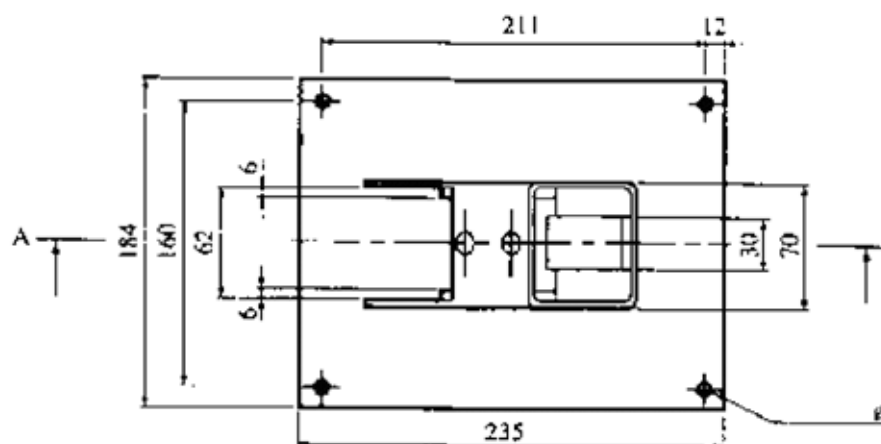
4. HEIMILDASKRÁ

- 1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria, 3. útgáfa, endurskoðuð. SP-rit nr.: ST/SG/AC.10/11/3. endurskoðun, 1999, bls. 342. Prófun O.2: Prófun fyrir oxandi vökva.

⁽¹⁰⁾ Sjá 1. rit í heimildarskrá fyrir túlkun niðurstaðna, innan ramma flutningareglugerða SP, úr prófunum með mörgum viðmiðunarefnum.

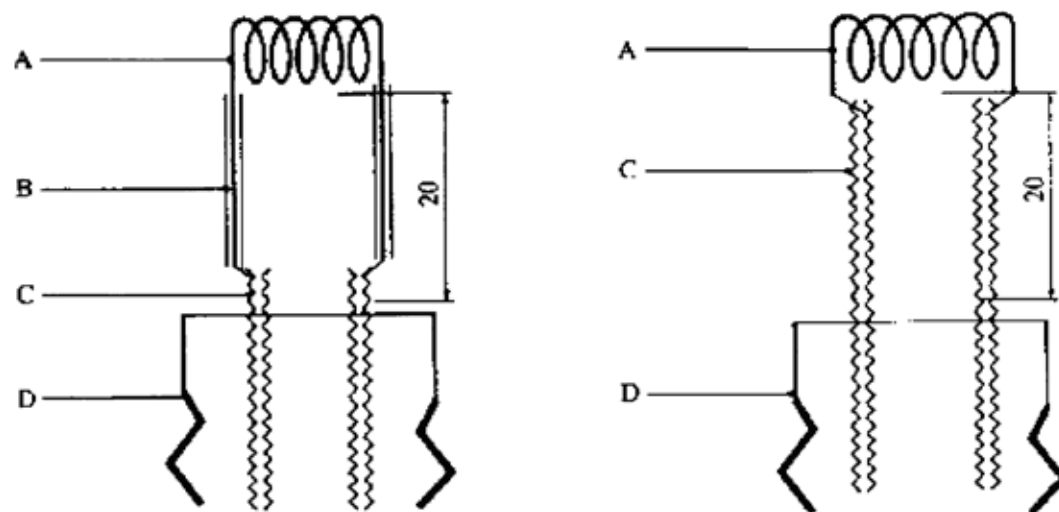
2. mynd

Standur



3. mynd

Kveikjukerfi



(A) Rafspóla

(B) Einangrun

(C) Rafskaut

(D) Kveikjutappi

Athugasemd: Nota má hvora útfærsluna sem er.“

2. VIÐAUKI B

„B.1a. BRÁÐ EITURHRIF VIÐ INNGJÖF UM MUNN – FASTSKAMMTAADFERÐIN

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD TG 420 (2001)

1.1 INNGANGUR

Í hefðbundnum aðferðum við mat á bráðum eiturrifum er dauði tilraunadýranna notaður sem endapunktur. Árið 1984 kom Breska eiturefnafræðifélagið með tillögu um nýja aðferð sem fólst í því að gefa tilraunadýrunum röð skammta af skilgreindri stærð (1. heimild). Í þessari aðferð var dauði tilraunadýranna ekki notaður sem endapunktur heldur var fylgst með því hvort í ljós kæmu skýr merki um eiturrif eftir gjöf tiltekins skammts úr viðkomandi skammtaröð. Í framhaldi af fullgildingar-rannsóknnum í lífi í Breska konungsríkinu (2. heimild) og á alþjóðavettvangi (3. heimild) var aðferðin samþykkt sem prófunaraðferð árið 1992. Síðan hafa tölfraðilegir eiginleikar fastskammtaaðferðarinnar verið metnir með reiknilíkönnum í röð rannsókna (4., 5. og 6. heimild). Með þessum rannsóknnum í lífi og með reiknilíkönnum hefur verið sýnt fram á að aðferðin er samanburðarnákvæm, útheimtir færri tilraunadýr og veldur minni þjáningum en hefðbundnar aðferðir og gerir það kleift að flokka efnin á svipaðan hátt og með öðrum aðferðum við prófun bráðra eiturrifa.

Í leiðbeiningaskjalinu um prófun á bráðum eiturrifum við inngjöf um munn (7. heimild) er að finna leiðbeiningar um val á heppilegustu prófunaraðferðinni fyrir tiltekið markmið. Í leiðbeiningarskjalinu eru líka viðbótarupplýsingar um framkvæmd og túlkun prófunaraðferðar B.1a.

Grundvöllur aðferðarinnar er að nota aðeins miðlungi eitraða skammta í meginrannsókninni og forðast að gefa skammta sem vænta má að séu banvænir. Þá þarf ekki að gefa skammta sem vitað er að valda verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða mjög ertandi verkana. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um sársauka eða mikla og viðvarandi þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt og taka jafnt tillit til þeirra við túlkun prófunarniðurstaðna og dýranna sem drepast í prófuninni. Fjallað er um viðmiðanir við töku ákvörðunar um að lóga dýrum sem eru dauðvona eða þjást mikið í sérstöku leiðbeiningarskjali (8. heimild).

Með aðferðinni fást upplýsingar sem gera kleift að meta hættulega eiginleika efnisins og skipa því í flokk samkvæmt hnattsamræmdu kerfi (GHS) til flokkunar á efnunum sem valda bráðum eiturrifum (9. heimild)

Prófunarstofan skal skoða allar fáanlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsókn hefst. Þetta eru upplýsingar um auðkenni og byggingu efnisins, eðlisefnafræðilega eiginleika þess, niðurstöður úr eiturrifaprófunum á efninu í glasi og í lífi, eiturfraðileg gögn um efni með skylda byggingu og upplýsingar um fyrirhuguð notkunarsvið efnisins. Þessar upplýsingar eru nauðsynlegar til að fullvissa alla hlutaðeigandi aðila um að prófunin hafi þýðingu ef vernda á heilbrigði manna og komi að gagni við val á heppilegum upphafsskammti.

1.2 SKILGREININGAR

Bráð eiturrif við inngjöf um munn: skaðleg áhrif sem koma fram eftir inntöku eins skammts af efninu eða eftir inngjöf margra skammta á innan við 24 klukkustundum.

Tafinn dauði: merkir að tilraunadýrið drepst hvorki né virðist dauðvona innan 48 klukkustunda en drepst síðar á 14 daga athugunartímabilinu.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg).

Augljós eiturrif: almennt hugtak sem lýsir greinilegum merkjum um eiturrif í kjölfar þess að prófunarefni er gefið (sjá t.d. 3. heimild) með þeim hætti að eftir næststærsta fastaskammtinn megi annaðhvort búast við að tilraunadýrin sýni merki um mikinn sársauka og viðvarandi og mikla þjáningu, séu dauðvona (viðmiðanir eru kynntar í leiðbeiningarskjali um mannúðlega endapunkta (8. heimild), eða líkur séu á dauða flestra tilraunadýranna.

GHS: hnattsamræmt flokkunarkerfi yfir efni og efnaþlöndur. Þessir aðilar unnu í sameiningu að kerfinu: Efnahags- og framfarastofnunin (heilbrigði manna og umhverfið), sérfræðinganefnd Sameinuðu þjóðanna um flutning á hættulegum varningi (eðlisefnafræðilegir eiginleikar) og Alþjóðavinnuáætlunastofnunin (hættutilkynningar) og fór samræming verksins fram innan ramma millistofnanaáætlunarinnar um örugga stjórnun á iðefnum (IOMC).

Yfirvofandi dauði: þegar þess er vænst að dýr verði dauðvona eða dauðt fyrir næsta áætlaða athugunartíma. Merki um slíkt ástand hjá nagdýrum geta verið krampar, hliðarlega, liggjandi staða og skjálfti. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild)).

LD₅₀ (miðgildisbanaskammtur): tölfræðilega reiknaður, stakur skammtur efnis sem búast má við að valdi dauða hjá 50% tilraunadýranna við inngjöf. LD₅₀-gildið er sett fram sem þyngd prófunarefnis á þyngdareiningu tilraunadýrs (mg/kg).

Háskammtur: skammtur við efri mörk prófunarinnar (2 000 til 5 000 mg/kg).

Dauðvona dýr: dýr sem er deyjandi eða lifir ekki þótt það sé meðhöndlað. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild)).

Fyrirsjáanlegur dauði: klínísk merki um dauða sem benda til þess að dýrið muni deyja á tilteknum tíma fyrir lok tilraunarinnar en dæmi um slík merki eru að dýrið getur hvorki drukkið né étið. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild)).

1.3 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Hópi tilraunadýra af sama kyni eru gefnir fastir skammtar, sem nema 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg (í undantekningartilvikum getur 5 000 mg/kg fastur viðbótarskammtur komið til greina, sjá lið 1.6.2), með þrepskiptri aðferð. Upphafsskammtastærð er valin á grundvelli undirbúningsrannsóknar sem sá skammtur sem vænta má að kalli fram einhver merki um eiturhrif án þess að valda alvarlegum eiturvekunum eða dauða. Í sérstöku leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (8. heimild) er klínískum einkennum og aðstæðum, sem tengjast sársauka, þjáningu og yfirvofandi dauða, lýst nánar. Gefa má öðrum hópum tilraunadýra fasta skammta sem eru stærri eða minni eftir því hvort merki um eiturhrif eða dauða koma fram eður ei. Þessu ferli er haldið áfram þar til fundinn er sá skammtur sem veldur greinilegum eiturhrifum eða dauða aðeins eins tilraunadýrs eða þar til engin sýnileg áhrif koma í ljós við stærsta skammt eða þar til minnsti skammtur veldur dauða tilraunadýra.

1.4 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐ

1.4.1 Val á dýrategund

Rottur eru ákjósanlegustu tilraunadýrin þótt einnig megi nota önnur nagdýr. Venjulega eru kvendýr notuð (7. heimild). Ástæðan er sú að kannanir á rituðum heimildum um hefðbundnar LD₅₀-prófanir sýna að venjulega er litill munur á næmi kynjanna en ef slíkur munur mælist á annað borð eru kvendýrin að jafnaði örlitlu næmari (10. heimild). Ef upplýsingar um eiturefnafræðilega eða eiturvefnafræðilega eiginleika efna með skylda byggingu benda hins vegar til þess að karldýrin kunni að vera næmari er rétt að nota það kyn. Séu prófanirnar gerðar á karldýrum skal færa gild rök fyrir því.

Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofni. Kvendýrin skulu vera eibærar (nulliparous) og ekki með fangi. Við upphaf skammtagjafar skal aldur einstakra dýra vera á bilinu 8 til 12 vikur og þyngd þeirra ekki víkja meira en $\pm 20\%$ frá meðalþyngd dýra sem hafa áður fengið skammta af efni.

1.4.2 Aðbúnaður og fæðun

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (± 3) °C. Þótt hlutfallslegur raki eigi að vera minnst 30% og helst ekki meiri en 70%, nema við þríf á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fæður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Hafa má nokkur dýr saman í búri sem fá sömu skammtastærð en ekki fleiri en svo að hægt sé að fylgjast vel með hverju dýri.

1.4.3 Tilraunadýrin undirbúin

Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að þau þekkist í sundur og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en skammtagjöf hefst til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.4 Tilreiðsla skammta

Að öllu jöfnu skal gefa mismunandi skammta af prófunarefnum með sama rúmmáli en í breytilegum styrk. Ef prófa á lokaefni í vökvaformi eða efnablöndu kann þó að henta betur við eftirfylgjandi áhættumat á því efni að nota prófunarefnið óþynnt, þ.e. í föstum styrk, enda gera sum stjórnvöld kröfu um slíkt. Í hvorugu tilvikinu má gefa meira en sem nemur rúmmáli hámarksskammtsins. Hámarksrúmmál vökvans, sem gefa má í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Þegar um nagdýr er að ræða skal rúmmálið að jafnaði ekki fara yfir 1 ml/100 g líkamsþyngdar; þó geta 2 ml/100 g líkamsþyngdar komið til greina þegar um vatnslausnir er að ræða. Mælt er með því að skammtarnir séu gefnir sem vatnslausn, sviflausn eða ýrulausn ef unnt er en að öðrum kosti sem lausn, sviflausn eða ýrulausn í olíu (t.d. maísolíu) og lausnir með öðrum burðarefnum geta einnig komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Skammtarnir skulu útbúnir rétt fyrir gjöf nema stöðugleiki tilreiðda efnisins, fyrir þann tíma sem það er notað, sé þekktur og hafi reynst viðunandi.

1.5 FRAMKVÆMD**1.5.1 Gjöf skammta**

Prófunarefnið er gefið í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafarslöngu. Ef svo ólíklega vill til að ekki er hægt að gefa efnið inn í einum skammti má gefa hann í nokkrum hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

Dýr skulu vera fastandi fyrir inngjöf (t.d. skulu rottur fá vatn en ekki fôður yfir nótt en mýs hins vegar fá vatn en ekki fôður í 3 – 4 klst.). Eftir föstutímabilið skal vigta dýrin og gefa þeim síðan prófunarefnið. Þegar prófunarefnið hefur verið gefið má láta rottur fasta í 3 – 4 klukkustundir í viðbót en mýs í 1 – 2 klst. Þegar efnisskammti er skipt í marga hluta og hann gefinn inn á ákveðnu tímabili getur verið nauðsynlegt að gefa dýrunum fôður og vatn, eftir því hve langt tímabilið er.

1.5.2 Undirbúningsrannsókn

Markmiðið með undirbúningsrannsókninni er að velja viðeigandi upphafsskammt fyrir meginrannsóknina. Prófunarefnið er gefið dýrum, einu í einu, eftir röð sem er tilgreind í flæðiritunum í 1. viðauka. Undirbúningsrannsókninni lýkur þegar unnt er að taka ákvörðun um upphafsskammt fyrir meginrannsóknina (eða ef dýr deyr eftir minnsta fastaskammti).

Upphafsskammtur fyrir undirbúningsrannsóknina er valinn úr föstu skammtastærðunum, 5, 50, 300 eða 2 000 mg/kg, og skal vera sá skammtur sem vænta má að framkalli augljós eitruhrif, ef unnt er, úr rannsóknnum í lífi og í glasi á sama iðefninu og á efnum með skylda byggingu. Liggi þessar upplýsingar ekki fyrir skal upphafsskammturinn vera 300 mg/kg.

A.m.k. 24 klst. skulu liða á milli skammtagjafa hjá hverju einstöku dýri. Fylgst skal með öllum dýrunum í a.m.k. 14 daga.

Í undantekningartilvikum, og þá aðeins með þeirri skírskotun að uppfylla verði tiltekin regluákvæði, kemur til greina að nota fastan viðbótarskammt á efri mörkunum 5000 mg/kg (sjá 3. viðauka). Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að dýr séu ekki prófuð á skammtasviði 5. flokks alþjóðlega, samræmda flokkunarkerfisins (2 000 – 5 000 mg/kg) enda kemur það aðeins til greina þegar miklar líkur eru á því að slíkt prófun hafi beina þýðingu fyrir heilsuvernd manna og vernd dýra eða umhverfisins.

Þegar dýr drepst eftir að hafa fengið minnsta, fasta prófunarskammt (5 mg/kg) í undirbúningsrannsókninni er venjan að hætta rannsókninni og flokka efnið í 1. flokk samkvæmt alþjóðlega, samræmda flokkunarkerfinu (sbr. 1. viðauka). Sé krafist frekari staðfestingar á flokkuninni er þó heimilt að bæta eftirfarandi við þetta ferli: Öðru dýri er gefinn skammturinn 5 mg/kg. Drepist þetta dýr telst flokkun í GHS-flokk 1 staðfest og er rannsókninni þá tafarlaust hætt. Haldi dýrið lífi fá að hámarki þrjú tilraunadýr til viðbótar skammtinn 5 mg/kg. Þar eð miklar líkur eru á því að dýrin drepist skal, af ástæðum er varða velferð dýra, gefa þeim með raðbundinni aðferð.

Tíminn milli þess að dýr fær skammt þar til næsta dýr fær skammt skal vera nægilega langur til að staðfesta að fyrri dýrið muni líklega halda lífi. Drepist annað dýr skal þegar í stað hætta raðbundinni gjöf skammta og ekki gefa fleiri dýrum skammt. Þar eð dauði annars dýrs (án tillits til þess hve mörg dýr hafa verið prófuð þegar prófun er hætt) leiðir til niðurstöðu A (dauði 2 eða fleiri dýral) er fylgt flokkunarreglu 2. viðauka við fastaskammtinn 5 mg/kg (1. flokkur ef 2 eða fleiri dýr drepast en 2. flokkur ef aðeins eitt dýr drepst). Í 4. viðauka eru auk þess leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESK-kerfinu þar til nýja, alþjóðlega, samræmda flokkunarkerfið verður innleitt.

1.5.3 Meginrannsókn

1.5.3.1 *Fjöldi dýra og skammtastærðir*

Á flæðiritunum í 2. viðauka má sjá hvernig haldið skal áfram eftir prófun með upphafsskammti. Gera þarf eitt af þrennu: hætta prófun og skipa efninu í viðeigandi hættuflokk, halda áfram prófun með stærri fastaskammti eða prófa með minni fastaskammti. Til að vernda dýrin skal gjöf skammts, af stærð sem olli dauða í undirbúningsrannsókninni, ekki endurtekin í meginrannsókninni (sjá 2. viðauka). Reynslan hefur sýnt að líklegast er að prófun með upphafsskammti geri kleift að flokka efnið og því verði frekari prófun óþörf.

Að jafnaði skal nota samtals fimm dýr af sama kyni fyrir hverja skammtastærð sem er til rannsóknar. Eitt þessara fimm dýra skal vera úr undirbúningsrannsókninni og hafa fengið skammt af þeirri stærð sem valin var og síðan fjögur dýr til viðbótar (nema í undantekningartilvikum þegar notuð er skammtastærð í meginrannsókninni sem var ekki með í undirbúningsrannsókninni).

Sá tími, sem liður á milli gjafar skammta af hverri stærð, ákvarðast af því hvenær merki um eiturrhif koma fram, hve lengi þau standa og hve alvarleg þau eru. Rétt er að bíða með að gefa dýrum næst skammt þar til vissa er fyrir því að dýrin, sem áður fengu skammt, lífi af. Mælt er með því, ef þörf krefur, að 3 til 4 dagar liði milli þess að skammtar af hverri stærð séu gefnir til að unnt sé að greina tafin eiturrhif. Þessi tími má vera lengri eða styttri eftir því sem við á, t.d. ef svörun er tvíræð.

Þegar til greina kemur að nota fastan skammt við efri mörkin 5 000 mg/kg skal framkvæmd prófunar vera skv. 3. viðauka (sjá einnig lið 1.6.2).

1.5.3.2 *Markprófun*

Markprófun er fyrst og fremst notuð þegar rannsakandinn hefur upplýsingar sem benda til þess að prófunarefnið sé ekki eitrað, þ.e. aðeins eitrað í skömmtum sem eru yfir lögbundnum háskömmtum. Upplýsingar um samsvarandi, prófuð efnasambönd eða samsvarandi, prófaðar efnablöndur eða vörur, geta gefið visbendingu um eiturrhif prófunarefnisins, að teknu tilliti til tegundar og hundraðshluta innihaldsefna sem vitað er að skipta máli í eiturefnafræðilegu tilliti. Sé lítið sem ekkert vitað um eiturrhif prófunarefnisins eða sé þess vænst að prófunarefnið sé eitrað ber að framkvæma meginrannsóknina.

Sem markprófun fyrir viðmiðunarregluna, sem hér er lýst, má, þegar framkvæmdin er samkvæmt venju, nota undirbúningsrannsókn með upphafsskammtinum 2 000 mg/kg (eða 5 000 mg/kg í undantekningartilvikum) og gefa síðan fjórum dýrum til viðbótar sama skammt.

1.6 ATHUGANIR

Hvert dýr fyrir sig er athugað a.m.k. einu sinni á fyrstu 30 mínútunum eftir skammtagjöf og með reglubundnu millibili fyrstu 24 klukkustundirnar, einkum skal gefa þeim sérstakan gaum fyrstu 4 klukkustundirnar, og daglega eftir það í alls 14 daga nema þau drepist í rannsókninni eða nauðsynlegt reynist að taka þau úr rannsókninni og lóga þeim á mannúðlegan hátt af ástæðum sem varða velferð dýra. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveðið með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og það má lengja gerist þess þörf. Miklu skiptir hvenær merki um eiturrhif koma fram og hverfa, einkum þegar eitrunareinkennin koma seint í ljós (11. heimild). Niðurstöður allra athugana skulu skráðar skipulega og halda skal sérstaka skýrslu fyrir hvert dýr.

Nauðsynlegt er að gera viðbótarathuganir ef dýrin halda áfram að sýna merki um eiturrhif. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að skjálfta, krampa, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dái. Taka skal mið af meginreglunum og viðmiðunum sem eru birtar í stuttu formi í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild).

Dauðvona dýr og dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða þjáningu skulu aflífuð á mannúðlegan hátt. Ef dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum eða komið að þeim dauðum skal skrá dauðastund eins nákvæmlega og unnt er.

1.6.1 Líkamsþyngd

Skrá skal þyngd hvers dýr stuttu áður en prófunarefnið er gefið og a.m.k. vikulega eftir það. Þyngdarbreytingar skulu reiknaðar og skráðar. Í lok prófunarinnar skal vigta dýrin sem eftir lifa áður en þau eru aflífuð á mannúðlegan hátt.

1.6.2 Meinafræði

Framkvæma ber stórsæja krufningu á öllum tilraunadýrunum, (einnig þeim sem drepast í prófuninni eða eru tekin úr henni af ástæðum er varða velferð dýra). Skrá skal allar stórsæjar, meinafræðilegar breytingar hjá hverju dýri. Einnig er hægt að fá gagnlegar upplýsingar með smásjárrannsókn á líffærum, þar sem stórsæjar, meinafræðilegar breytingar sjást, úr dýrum sem halda lífi í 24 klukkustundir eða lengur eftir gjöf upphafsskammts.

2. GÖGN

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Fyrir hvern prófunarhóp skal auk þess taka saman í töflu öll gögn sem sýna fjölda þeirra dýra sem eru notuð, fjölda dýra sem sýna merki um eituhrif, fjölda dýra sem drápast í prófun, eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, dauðastund hvers dýrs, lýsingu á eituhrifum, tímann sem þau vara og hvort þau ganga til baka og niðurstöður úr krufningu.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtalдар upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni eftir því sem við á:

Prófunarefni:

- eðliseiginleikar, hreinleiki og, ef við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar (þ.m.t. breyting úr einu myndbrigði í annað),
- gögn til sanngreiningar, þ.m.t. CAS-númer.

Burðarefni (ef við á):

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

- dýrategund/stofn dýra,
- örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,
- fjöldi, aldur og kyn dýranna (ásamt forsendum fyrir því að nota karldýr í stað kvendýra),
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunarskilyrði:

- ítarlegar upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins, þ.m.t. um eðlisástand efnisins sem er gefið,
- nákvæmar upplýsingar um inngjöf prófunarefnisins, þ.m.t. um skammtastærðir og tíma inngjafar,
- nákvæmar upplýsingar um gæði fòðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fòðurs og uppruni vatns),
- forsendur fyrir vali á upphafsskammti.

Niðurstöður:

- töflusetning gagna yfir svörun eftir skammtastærð fyrir hvert dýr (þ.e. dýr sem sýna merki um eiturrhif, þ.m.t. dauðsföll, eðli áhrifanna, hve alvarleg þau eru og hve lengi þau vara),
- töflusetning gagna yfir líkamsþyngd og breytingar á líkamsþyngd,
- þyngd hvers dýrs daginn sem því er gefinn skammturinn, vikulega eftir það og þegar þau drepast eða þeim er lógað,
- dauðadægur og dauðastund ef dýrin hafa drepist áður en átti að lóga þeim,
- hvenær merki um eiturrhif koma fram, hvernig framvindan er og hvort eiturrhifin ganga til baka, fyrir hvert dýr,
- niðurstöður krufningar og vefjameinafræðilegar niðurstöður fyrir hvert dýr, liggi þær fyrir.

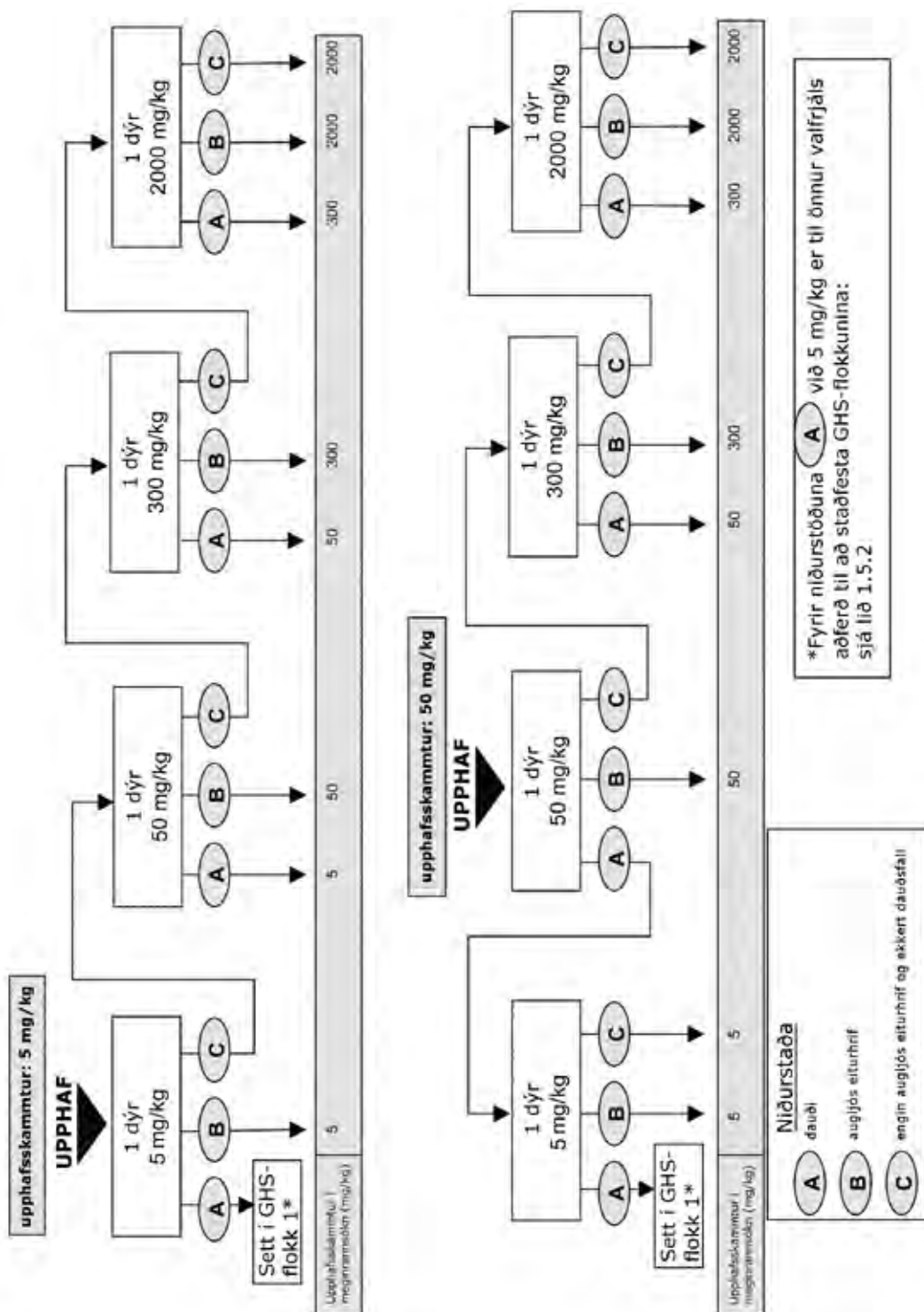
Umræða og túlkun niðurstaðna.

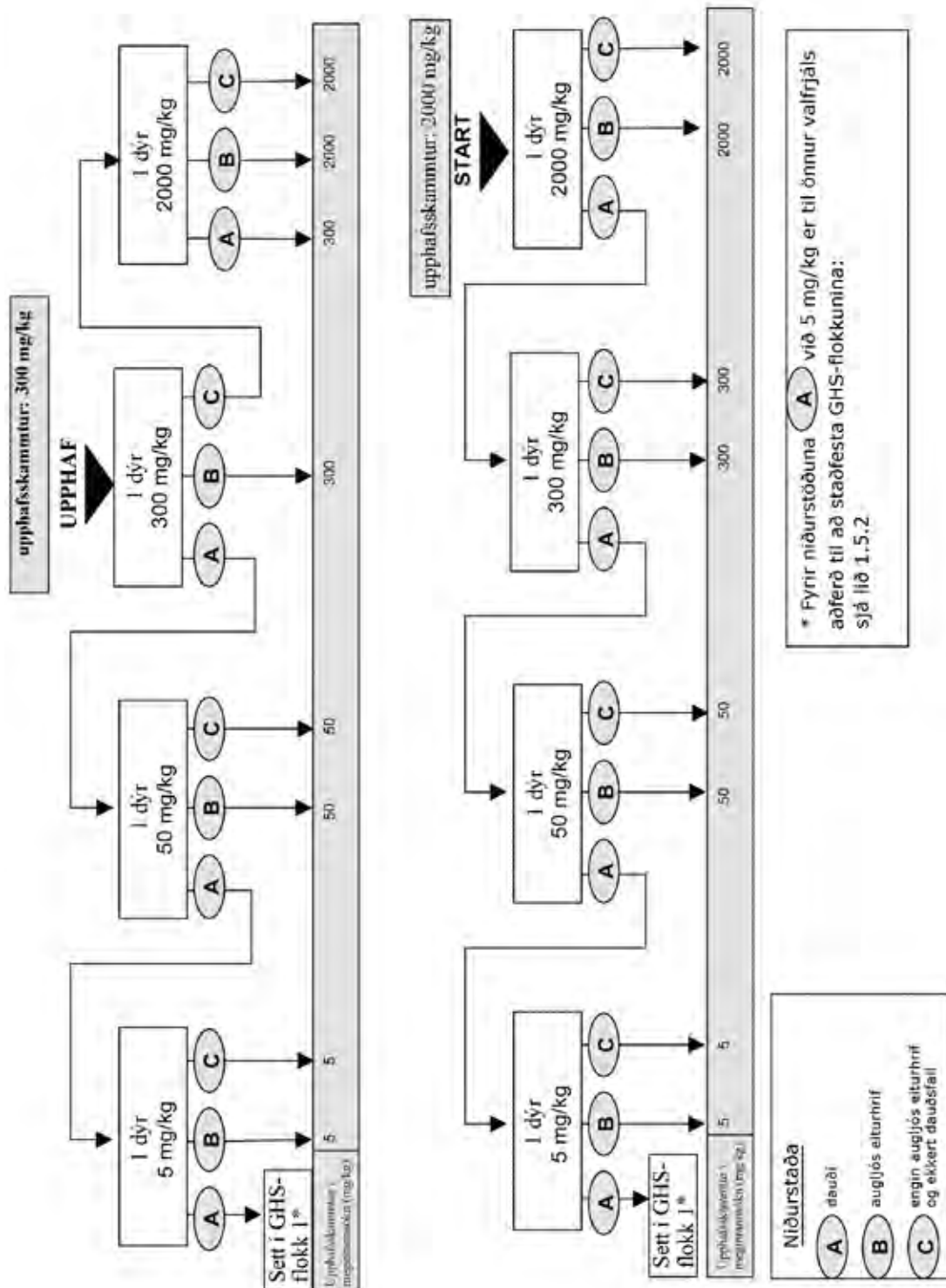
Ályktanir.

4. HEIMILDASKRÁ

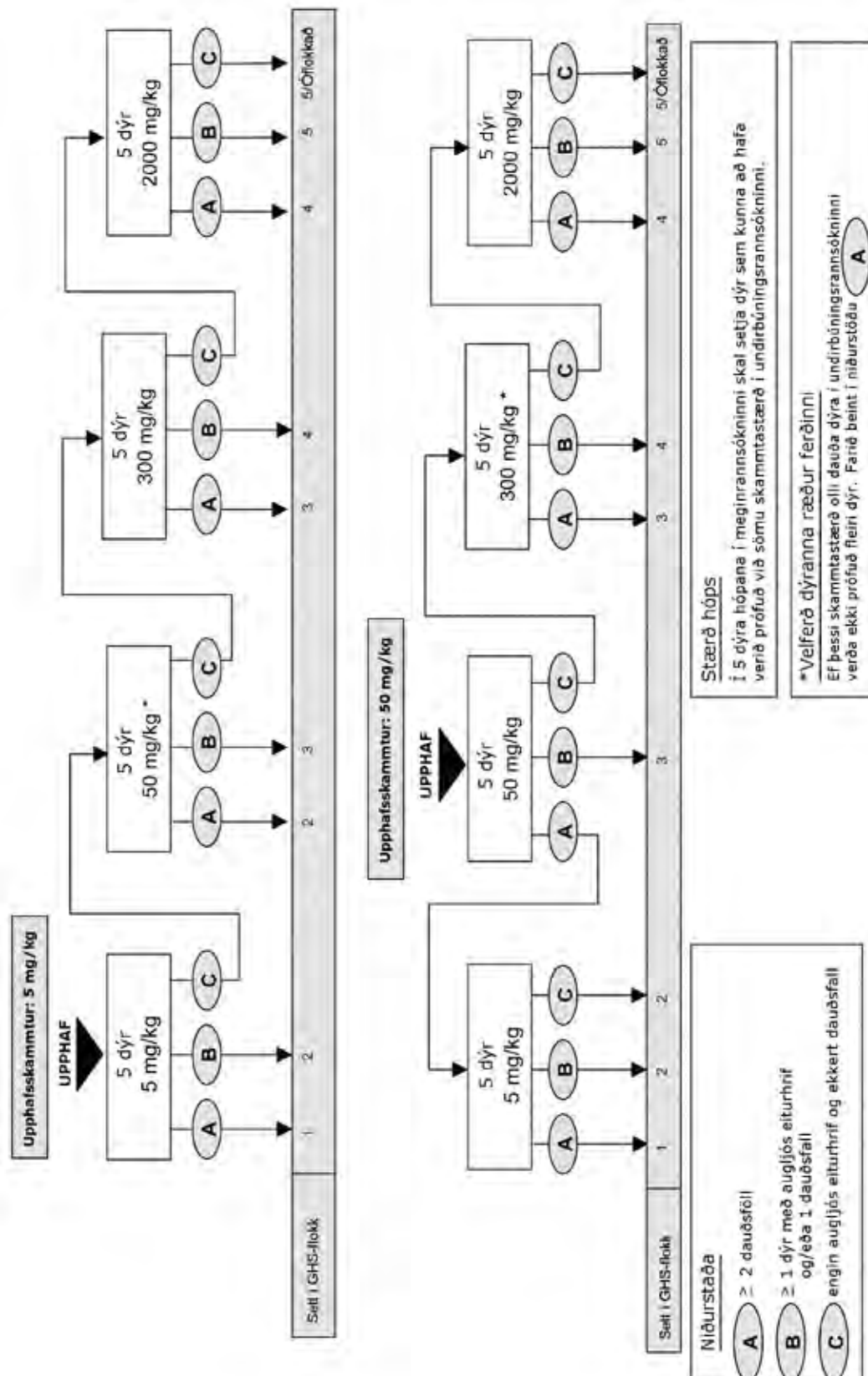
- 1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85–92.
- 2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. og Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279–291.
- 3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. og Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469–482.
- 4) Whitehead, A. og Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313–324.
- 5) Stallard, N. og Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315–323. *Human Exptl. Toxicol.*
- 6) Stallard, N., Whitehead, A. og Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183–196.
- 7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. París
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.
- 9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, 2. hluti, bls. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. og Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223–231.
- 11) Chan P.K. og A.W. Hayes (1994) Acute Toxicity and Eye Irritation, 16. kafli. Í: Principles and Methods of Toxicology. 3. útgáfa. A.W. Hayes, ritstjóri. Raven Press, Ltd. New York, USA.

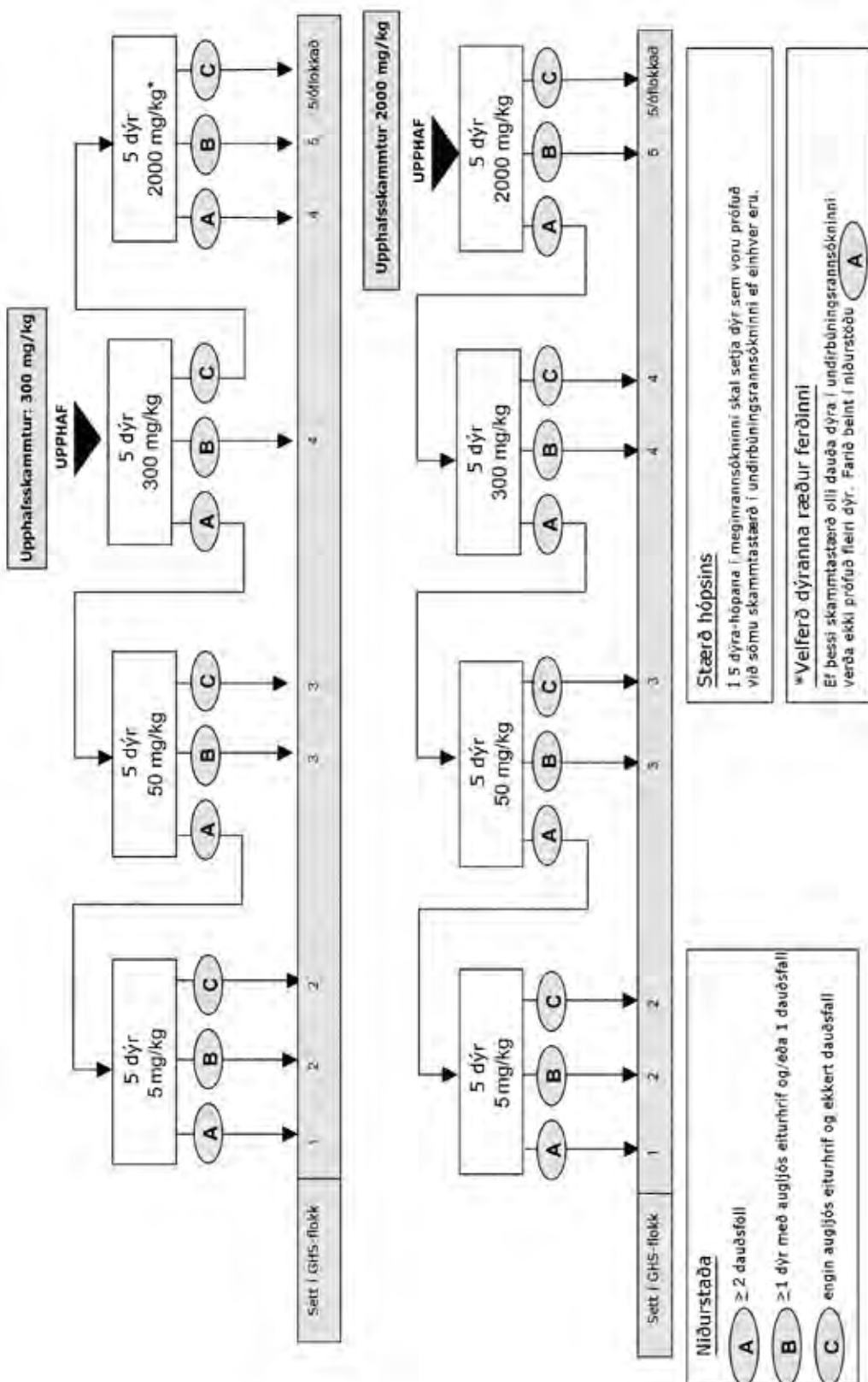
1. VIDAUKI: FLÆDIRIT FYRIR UNDIRBÚNINGSRANNSÓKN





2. VIÐAUKI: FLÆDIRIT FYRIR MEGINRANNSÓKN





3. VIÐAUKI

VIÐMIÐANIR FYRIR FLOKKUN PRÓFUNAREFNA SEM ERU TALIN HAFA HÆRRI LD₅₀-GILDI EN 2 000 MG/KG OG EKKI ÞARF AÐ PRÓFA

Viðmiðunum fyrir hættuflokk 5 er ætlað að auðvelda sanngreiningu prófunarefna sem tiltölulega lítil hætta er á að hafi bráð eiturrhif en geta við tilteknar aðstæður verið hættuleg viðkvæmum þýðum. Talið er að LD₅₀-gildi þessara efna við inngjöf um munn eða áburð á húð sé á bilinu 2000 – 5000 mg/kg eða sambærilegir skammtar fyrir aðrar íkomuleiðir. Prófunarefni má flokka í hættuflokk, sem er skilgreindur með: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (í 5. flokki skv. GHS), í eftirfarandi tilvikum:

- a) ef það er felld undir þennan flokk samkvæmt einhverju prófunarkerfanna í 2. viðauka sakir fjölda dauðsfalla,
- b) ef til eru áreiðanlegar visbendingar um að LD₅₀-gildið liggi á gildissviði sem svarar til 5. flokks eða ef aðrar dýrannsóknir eða eiturrhif á menn benda til þess að heilbrigði manna sé alvarleg hætta búin,
- c) með framreikningi, mælingum eða mati á gögnum ef ekki er ástæða til að skipa því í hærri hættuflokk og
 - fyrir liggja áreiðanlegar upplýsingar sem benda til töluverðra eiturrhifa í mönnum eða
 - dýr drepast þegar prófað er með inngjöf um munn upp að gildum sem svara til 4. flokks eða
 - ef álit sérfræðings staðfestir veruleg, klínísk einkenni eiturrhifa þegar prófað er upp að gildum sem samsvara 4. flokki nema um sé að ræða niðurgang, hárris eða óhrjálegt útlit eða
 - ef álit sérfræðings staðfestir áreiðanlegar upplýsingar úr öðrum dýrannsóknunum sem benda til möguleika á verulegum bráðahrifum

PRÓFUN MEÐ SKAMMTASTÆRDIR YFIR 2000 mg/kg

Í undantekningartilvikum, og þá aðeins með þeirri skirskotun að uppfylla verði tiltekin regluákvæði, er heimilt að nota fastan viðbótarskammt á efri mörkunum 5000 mg/kg. Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að ekki sé prófað með 5000 mg/kg, enda kemur það aðeins til greina þegar miklar líkur eru á því að slík prófun hafi beina þýðingu fyrir heilsuvernd manna og vernd dýra eða umhverfisins (9. heimild).

Undirbúningsrannsókn

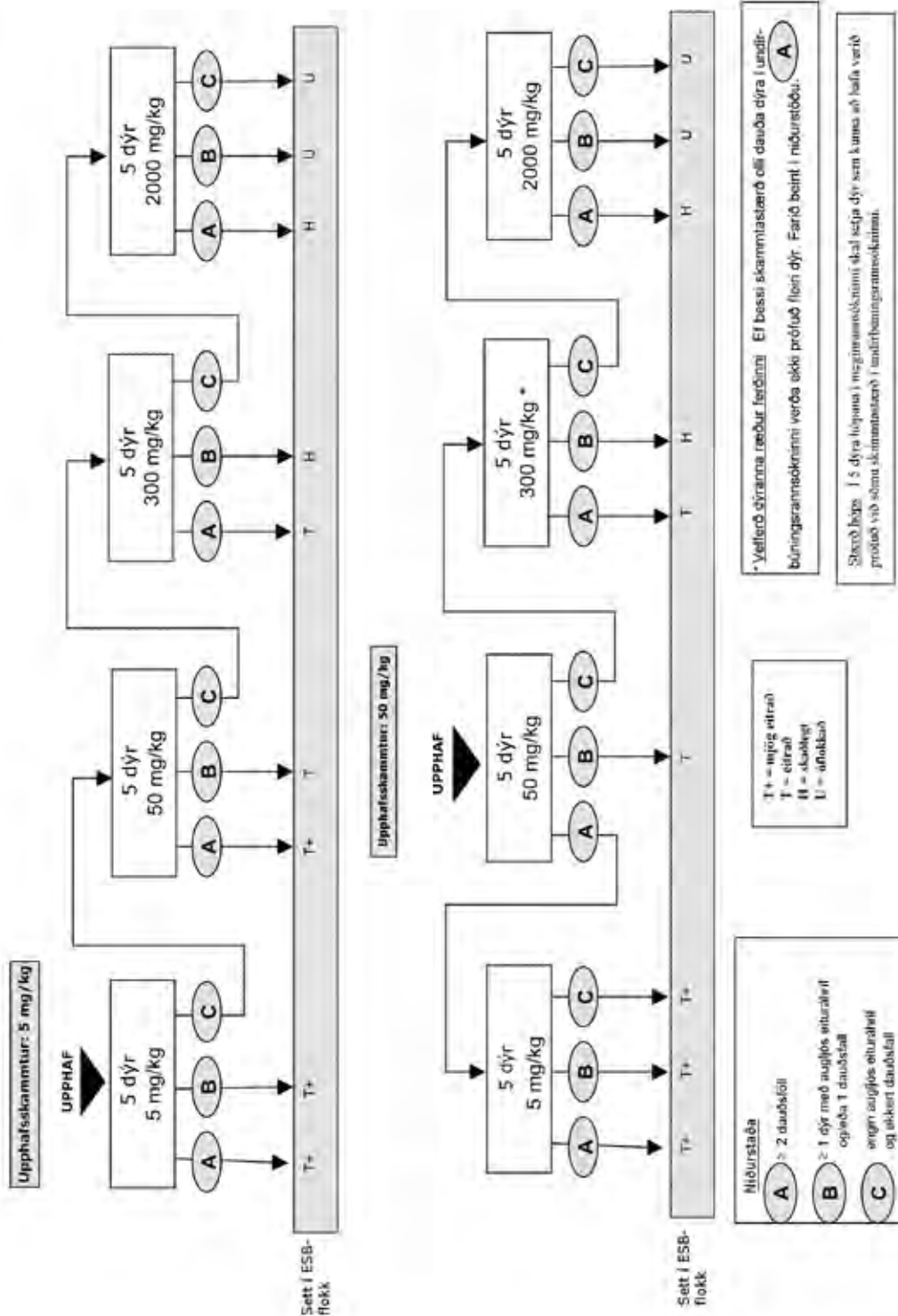
Gildissvið reglnanna um ákvarðanatöku í raðbundinni aðferð, sem birtar eru í 1. viðauka, er látið ná til skammts sem nemur 5000 mg/kg. Þetta þýðir að þegar notaður er upphafsskammturinn 5000 mg/kg í undirbúningsrannsókn þarf að prófa annað dýr með 2000 mg/kg ef niðurstaðan er A (dauði) en niðurstöðurnar B eða C (augljós eiturrhif eða engin eiturrhif) gera kleift að velja 5000 mg/kg sem upphafsskammt meginrannsóknarinnar. Á samsvarandi hátt gildir að ef notaður er annar upphafsskammtur en 5000 mg/kg í prófun skal farið upp í 5000 mg/kg í prófuninni ef niðurstöðurnar B eða C fást við 2000 mg/kg og gefi 5000 mg/kg síðan niðurstöðuna A skal upphafsskammtur í meginrannsókninni vera 2000 mg/kg en fáið niðurstöðurnar B og C skal upphafsskammturinn í meginrannsókninni vera 5000 mg/kg.

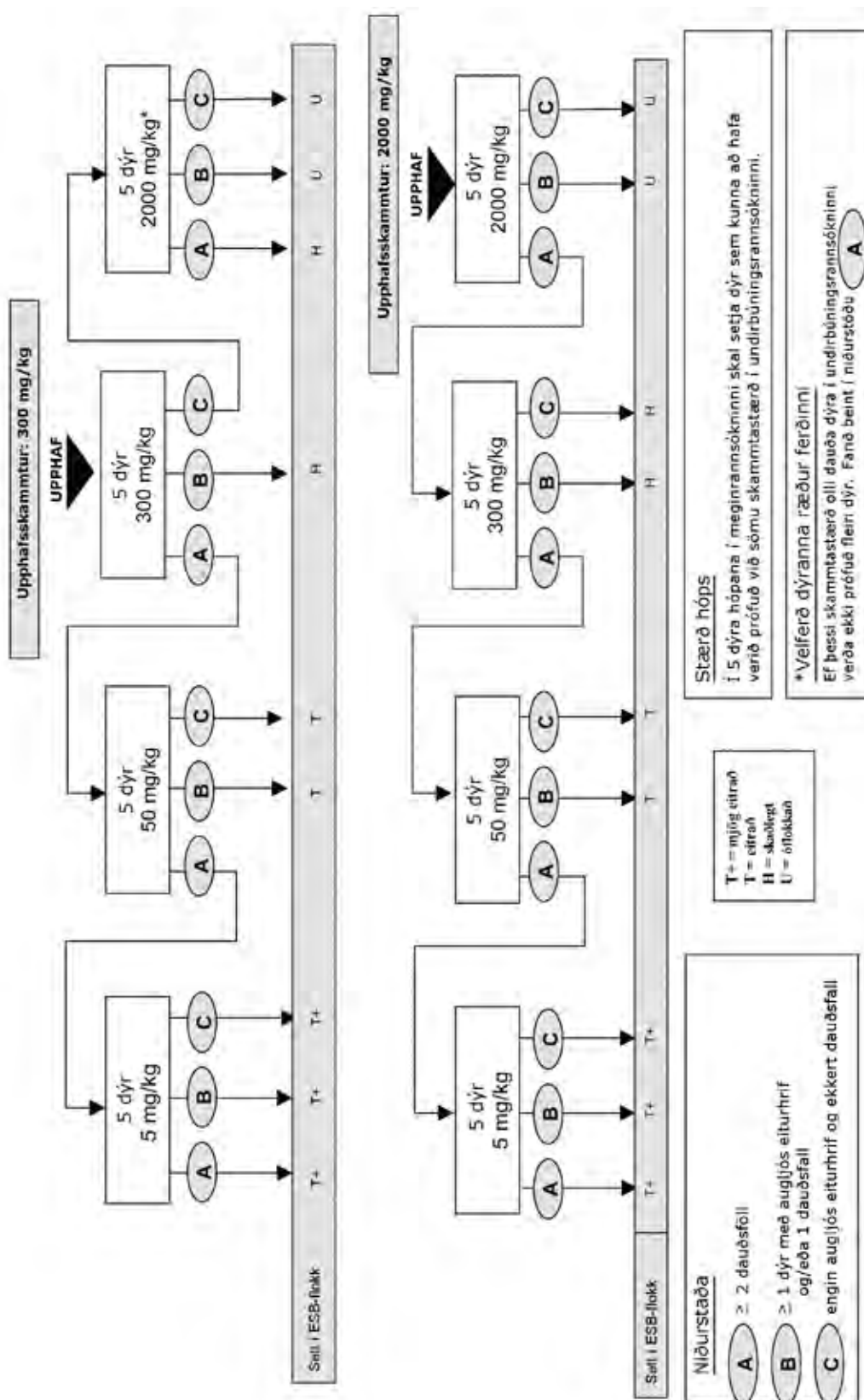
Meginrannsóknin

Gildissvið reglnanna um ákvarðanatöku í raðbundinni aðferð, sem birtar eru í 2. viðauka, er látið ná til skammts sem nemur 5000 mg/kg. Þetta þýðir að þegar notaður er upphafsskammturinn 5000 mg/kg í meginrannsókninni þarf að prófa annan hóp með 2000 mg/kg ef niðurstaðan er A (≥ 2 dauðsföll) en niðurstaðan B (augljós eiturrhif og/eða ≤ 1 dauðsfall) eða C (engin eiturrhif) leiða til þess að efnið verður ekki flokkað skv. GHS. Á sama hátt gildir að ef notaður er annar upphafsskammtur en 5000 mg/kg í prófun skal farið upp í 5000 mg/kg í prófuninni ef niðurstaðan C fæst við 2000 mg/kg og gefi 5000 mg/kg síðan niðurstöðuna A skal flokka efnið í GHS-flokk 5 en ef niðurstaðan verður B eða C verður efnið ekki flokkað.

4. VÍÐAUKI

PRÓFUNARÁÐFERÐ B.1a – Leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu á aðlögunartímabili fram að fullri innleiðingu GHS (hnattsamræmda flokkunarkerfisins), (úr 8. ríti i heimildaskrá)





2. VIÐAUKI C

„B.1 b BRÁÐ EITURHRIF VIÐ INNGJÖF UM MUNN – AÐFERÐ TIL AÐ ÁKVARÐA FLOKKA BRÁÐRA EITURHRIFA

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD TG 423 (2001)

1.1 INNGANGUR

Aðferðin til að ákvarða flokka bráðra eiturrhifa (1. heimild), sem sett er fram í þessari prófun, er þrepskipt aðferð þar sem notuð eru 3 dýr af sama kyni á hverju þrepi. Til að unnt sé að dæma um bráð eiturrhif prófunarefnisins þarf að meðaltali 2 – 4 þrep, eftir hlutfalli dauðsfalla og/eða dauðvona dýra. Þessi aðferð er samanburðarnákvæm, útheimtir mjög fá dýr og gerir það kleift að flokka efnið á svipaðan hátt og með öðrum aðferðum við prófun á bráðum eiturrhifum. Aðferðin til að ákvarða flokka bráðra eiturrhifa byggist á líftölfræðilegu mati (2., 3., 4. og 5. heimild) með föstum skömmtum með nægilegu millibili til að unnt sé að taka ákvörðun um röðun efnisins með tilliti til flokks og hættumats. Aðferðin, sem var samþykkt 1996, var nánast fullgilt í lífi með hliðsjón af LD₅₀-gögnum úr rituðum heimildum, bæði á innlendum vettvangi (6. heimild) og alþjóðavettvangi (7. heimild).

Í leiðbeiningarskjalinu um prófun á bráðum eiturrhifum við inngjöf um munn (8. heimild) er að finna leiðbeiningar um val á heppilegustu prófunaraðferð fyrir tiltekið markmið. Í leiðbeiningarskjalinu eru líka viðbótarupplýsingar um framkvæmd og túlkun prófunaraðferðar B.1b.

Ekki þarf að gefa skammta sem vitað er að valda verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða mjög ertandi verkana. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um sársauka eða mikla og viðvarandi þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt og taka sama tillit til þeirra við túlkun prófunarniðurstaðna og dýra sem drepast í prófuninni. Fjallað er um viðmiðanir við töku ákvörðunar um að lóga dýrum, sem eru dauðvona eða þjást mikið, í sérstöku leiðbeiningarskjali (9. heimild).

Aðferðin felur í sér notkun fyrirfram skilgreindra skammta og niðurstöðurnar gera kleift að skipa efninu í flokk samkvæmt hnattsamræmda kerfinu (GHS) til flokkunar á efnunum sem valda bráðum eiturrhifum (10. heimild)

Að meginreglu til er tilgangurinn með aðferðinni ekki sá að reikna LD₅₀-gildið nákvæmlega en hún gefur kost á að ákvarða afmörkuð váhrifasvið, þar sem vænta má að tilraunadýr láti lífið, þar eð dauði tiltekins hlutfalls dýranna er enn helsti endapunktur þessarar prófunar. Til að unnt sé að ákvarða LD₅₀-gildi með þessari aðferð skulu a.m.k. tvær skammtastærðir leiða til herra dánarhlutfalls en 0% og lægra en 100%. Þar eð prófunin er alltaf framkvæmd með fyrirfram ákveðnum skammtastærðum, án tillits til prófunarefnis, og flokkunin ótvírætt bundin fjölda tilraunadýranna í mismunandi ástandi, aukast möguleikarnir á samræmi í prófunarskýrslum og endurtekningarhæfni milli rannsóknarstofa.

Rannsóknarstofan skal skoða allar fáanlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsókn hefst. Þetta eru upplýsingar um tegund og byggingu efnisins, eðlisefnafræðilega eiginleika þess, niðurstöður úr eiturrhifaprófunum á efninu í glasi og í lífi, eiturrhifaleg gögn um efni með skylda byggingu og upplýsingar um fyrirhuguð notkunarsvið efnisins. Þessar upplýsingar eru nauðsynlegar til að fullvissa alla hlutaðeigandi aðila um að prófunin hafi þýðingu fyrir heilsuvernd manna og komi að gagni við val á heppilegasta upphafsskammtinum.

1.2 SKILGREININGAR

Bráð eiturrhif við inngjöf um munn: vísar til skaðlegra áhrifa sem koma fram eftir inngjöf eins skammts efnis eða inngjöf margra skammta efnis sem gefnir eru á einum sólarhring.

Tafinn dauði: merkir að tilraunadýrið drepst hvorki né virðist dauðvona innan 48 klukkustunda en drepst síðar á 14 daga athugunartímabilinu.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þýngd prófunarefnis á hverja þýngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg).

GHS: hnattsamræmt flokkunarkerfi yfir efni og efnablöndur. Þessir aðilar unnu í sameiningu að kerfinu: Efnahags- og framfarastofnunin (heilbrigði manna og umhverfið), sérfræðinganefnd Sameinuðu þjóðanna um flutning á hættulegum varningi (eðlisefnafræðilegir eiginleikar) og Alþjóðavinnuumálastofnunin (hættutilkynningar) og för samræming verksins fram innan ramma millistofnanaáætlunarinnar um örugga stjórnun á iðefnum (IOMC).

Yfirvofandi dauði: þegar þess er vænst að dýr verði að dauða komið eða dautt fyrir næsta áætlaða athugunartíma. Merki um slíkt ástand hjá nagdýrum geta verið krampar, hliðarlega, liggjandi staða og skjálfti (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild).

LD₅₀ (miðgildisbanaskammtur við inngjöf um munn): tölfræðilega reiknaður stakur skammtur efnis sem búast má við að valdi dauða hjá 50% tilraunadýranna þegar hann er gefinn um munn. LD₅₀-gildið er sett fram sem þýngd prófunarefnis á þýngdareiningu tilraunadýrs (mg/kg).

Háskammtur: skammtur við efri mörk prófunarinnar (2 000 eða 5 000 mg/kg).

Dauðvona dýr: dýr sem er deyjandi eða lifir ekki þótt það sé meðhöndlað (sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild).

Fyrirsjáanlegur dauði: klínísk merki um dauða sem benda til þess að dýrið muni drepast á tilteknum tíma fyrir lok tilraunarinnar en dæmi um slík merki eru að dýrið getur hvorki drukkið né étið. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild).

1.3 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNAR

Grundvöllur prófunarinnar, sem byggist á þrepskiptri aðferð þar sem notuð eru sem fæst tilraunadýr á hverju þrepi, er að afla nægra upplýsinga um bráð eituhrif efnisins svo að unnt sé að flokka það. Einn af föstum skömmtum efnisins er gefinn hópi tilraunadýra um munn. Efnið er prófað í þrepum og þrjú tilraunadýr af sama kyni (venjulega kvendýr) notuð í hverju þrepi. Næsta þrep ræðst af því hvort efnisskammtur á tilteknu þrepi veldur dauða dýranna eða ekki, þ.e.a.s.:

- ekki er þörf á frekari prófun,
- þremur dýrum til viðbótar er gefinn sami skammtur,
- þremur dýrum til viðbótar er gefinn næsti skammtur fyrir ofan eða neðan.

Framkvæmd prófunar er lýst ítarlega í I. viðauka. Þessi aðferð gerir kleift að flokka efnið í einn af eituhrifaflokkunum sem eru ákvarðaðir með föstum LD₅₀-þröskuldsgildum.

1.4 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1 Val á dýrategund

Rottur eru ákjósanlegustu tilraunadýrin þótt einnig megi nota önnur nagdýr. Venjulega eru kvendýr notuð (9. heimild). Ástæðan er sú að kannanir á rituðum heimildum um hefðbundnar LD₅₀-prófanir sýna að þótt litill munur sé á næmi kynjanna eru kvendýrin að jafnaði örlitlu næmari ef slíkur munur mælist á annað borð (11. heimild). Ef upplýsingar um eiturefnafræðilega eða eituhvarfafræðilega eiginleika efna með skylda byggingu benda til þess að karldýrin kunni að vera næmari er rétt að nota það kyn. Séu prófanirnar gerðar á karldýrum skal færa gild rök fyrir því.

Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofni. Kvendýrin skulu vera eibærar og ekki með fangi. Við upphaf skammtagjafar skal aldur einstakra dýra vera á bilinu 8 til 12 vikur og þýngd þeirra ekki víkja meira en $\pm 20\%$ frá meðalþýngd dýra sem hafa áður fengið skammta af efninu.

1.4.2 Aðbúnaður og fæðun

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (± 3) °C). Þótt hlutfallslegur raki eigi að vera minnst 30% og helst ekki meiri en 70%, nema við þríf á vistarverunum, er kjöraki 50 – 60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fæður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Hafa má nokkur dýr saman í búri eftir skammtastærð en ekki fleiri en svo að hægt sé að fylgjast vel með hverju dýri.

1.4.3 Tilraunadýrin undirbúin

Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að þau þekkist í sundur og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en gjöf skammta hefst til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.4 Tilreiðsla skammta

Að öllu jöfnu skal gefa mismunandi skammta af prófunarefnum með sama rúmmáli en í breytilegum styrk. Ef prófa á efni í vökvaformi eða efnablöndu kann þó að henta betur, við eftirfylgjandi áhættumat á því efni, að nota prófunarefnið óþynnt, þ.e. í föstum styrk, enda gera sum stjórnvöld kröfu um slíkt. Í hvorugu tilvikinu má gefa meira en sem nemur rúmmáli hámarksskammtsins. Hámarksrúmmál vökva, sem gefa má í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Þegar um nagdýr er að ræða skal rúmmálið að jafnaði ekki fara yfir 1 ml/100 g líkamsþyngdar; þó geta 2 ml/100 g líkamsþyngdar komið til greina þegar um vatnslausnir er að ræða. Mælt er með því að skammtarnir séu gefnir sem vatnslausn, sviflausn eða ýrulausn ef unnt er en að öðrum kosti sem lausn, sviflausn eða ýrulausn í olíu (t.d. máisolíu) og lausnir með öðrum burðarefnum geta einnig komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Skammtarnir skulu útbúnir rétt fyrir gjöf nema stöðugleiki tilreiðda efnisins fyrir þann tíma, sem það er notað, sé þekktur og hafi reynst viðunandi.

1.5 FRAMKVÆMD PRÓFUNAR

1.5.1 Gjöf skammta

Prófunarefnið er gefið í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafarslöngu. Ef svo ólíklega vill til að ekki sé hægt að gefa inn í einum skammti má gefa skammtinn í nokkrum hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

Dýr skulu vera fastandi fyrir inngjöf (t.d. skulu rottur fá vatn en ekki fæður yfir nótt en mýs hins vegar fá vatn en ekki fæður í 3 – 4 klst.). Eftir föstutímabilið skal vigta dýrin og gefa þeim síðan prófunarefnið. Þegar prófunarefnið hefur verið gefið má láta rottur fasta í 3 – 4 klukkustundir í viðbót en mýs í 1 – 2 klst. Þegar efnisskammti er skipt í marga hluta og hann gefinn inn á ákveðnu tímabili getur verið nauðsynlegt að gefa dýrunum fæður og vatn, eftir því hve langt tímabilið er.

1.5.2 Fjöldi dýra og skammtastærðir

Á hverju þrepi eru notuð þrjú dýr. Skammtastærðin í upphafi er valin úr fjórum föstum stærðum, þ.e. 5, 50, 300 eða 2 000 mg á hvert kg líkamsþyngdar. Í upphafi skal nota þá skammtastærð sem er líklegust til að valda dauða sumra dýranna sem fá skammtinn. Á flæðiritunum í 1. viðauka er lýst framkvæmd prófunar fyrir hvern upphafsskammt. Í 4. viðauka eru auk þess leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu þar til nýja, alþjóðlega, samræmda flokkunarkerfið verður innleitt.

Þegar ráða má af fyrirbyggjandi upplýsingunum að ólíklegt sé að stærsti upphafsskammtur (2 000 mg/kg líkamsþyngdar) valdi dauða ber að gera markprófun. Ef engar upplýsingar eru til um prófunarefnið er mælt með því, af mannúðarástæðum, að nota upphafsskammtinn 300 mg á hvert kg líkamsþyngdar.

Sá tími, sem líður á milli meðhöndlunar hinna ýmsu hópa, ákvarðast af því hvenær merki um eitruhrif koma fram, hve lengi þau standa og hve alvarleg þau eru. Rétt er að biðja með að gefa dýrum næsta skammt þar til vissi er fyrir því að dýrin, sem áður fengu skammt, hafa lifað af.

Í undantekningartilvikum, og þá aðeins með þeirri skírskotun að uppfylla verði tiltekin regluákvæði, kemur til greina að nota viðbótarskammt við efri mörkin 5000 mg/kg (sjá 2. viðauka). Vegna velferðar tilraunadýranna er hvatt til þess að dýr séu ekki prófuð á skammtasviði. 5. flokks alþjóðlega, samræmda flokkunarkerfisins (2000 – 5000 mg/kg) enda kemur það aðeins til greina þegar miklar líkur eru á því að slík prófun hafi beina þýðingu fyrir heilsuvernd manna og vernd dýra eða umhverfisins.

1.5.3 Markprófun

Markprófun er fyrst og fremst notuð þegar rannsakandinn hefur upplýsingar sem benda til þess að prófunarefnið sé ekki eitruð, þ.e. aðeins eitruð í skömmtum sem eru yfir lögbundnum háskömmtum. Upplýsingar um samsvarandi, prófuð efnasambönd eða samsvarandi, prófaðar efnablöndur eða vörur, geta gefið vísbendingu um eitruhrif prófunarefnisins, að teknu tilliti til tegundar og hundradshluta innihaldsefna sem vitað er að skipta máli í eiturefnafræðilegu tilliti. Sé lítið sem ekkert vitað um eitruhrif prófunarefnisins eða sé þess vænst að prófunarefnið sé eitruð ber að framkvæma meginrannsóknina.

Framkvæma má markprófun með einum skammti af stærðinni 2 000 mg/kg líkamsþyngdar á sex dýrum (þremur á hverju þrepi). Í undantekningartilvikum er heimilt að framkvæma markprófun einungis með skammtastærðinni 5000 mg/kg á þremur dýrum (sjá 2. viðauka). Ef prófunarefnið veldur dauða kann að vera þörf fyrir frekari prófun á næsta þrepi fyrir neðan.

1.6 ATHUGANIR

Hvert dýr fyrir sig er athugað a.m.k. einu sinni á fyrstu 30 mínútunum eftir skammtagjöf og með reglubundnu millibili fyrstu 24 klukkustundirnar, einkum skal gefa þeim sérstakan gaum fyrstu 4 klukkustundirnar, og daglega eftir það í alls 14 daga nema nauðsynlegt reynist að taka þau úr rannsókninni og lóga þeim á mannúðlegan hátt af ástæðum sem varða velferð dýra eða þau deyi í rannsókninni. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveðið með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og það má lengja gerist þess þörf. Miklu skiptir hvenær merki um eitruhrif koma fram og hverfa, einkum þegar eitrunareinkennin koma seint í ljós (12. heimild). Niðurstöður allra athugana skulu skráðar skipulega og halda skal sérstaka skýrslu fyrir hvert dýr.

Nauðsynlegt er að gera viðbótarathuganir ef dýrin halda áfram að sýna merki um eitruhrif. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að skjálfta, krampa, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dái. Taka skal mið af meginreglunum og viðmiðununum sem eru birtar í stuttu formi í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild) Dauðvona dýr og dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða þjáningu skulu aflífuð á mannúðlegan hátt. Þegar dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum eða komið að þeim dauðum, skal skrá dauðastund eins nákvæmlega og hægt er.

1.6.1 Líkamsþyngd

Skrá skal þyngd hvers dýrs stuttu áður en prófunarefnið er gefið og a.m.k. vikulega eftir það. Þyngdarbreytingar skulu reiknaðar og skráðar. Í lok prófunarinnar skal vigta dýrin, sem eftir lifa, og aflífa þau á mannúðlegan hátt.

1.6.2 Meinafræði

Framkvæma ber stórsæja krufningu á öllum tilraunadýrunum, (einnig þeim sem drepast í prófuninni eða eru tekin úr henni af ástæðum er varða velferð dýra). Skrá skal allar stórsæjar, meinafræðilegar breytingar í hverju dýri. Einnig er hægt að fá gagnlegar upplýsingar með smásjárrannsókn á líffærum, þar sem stórsæjar meinafræðilegar breytingar sjást, úr dýrum sem halda lífi í 24 klukkustundir eða lengur.

2. GÖGN

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Fyrir hvern prófunarhóp skal auk þess taka saman í töflu öll gögn sem sýna fjölda þeirra dýra sem eru notuð, fjölda dýra sem sýna merki um eiturhrif, fjölda dýra sem drápuð í prófun, eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, dauðastund hvers dýrs, lýsingu á eiturhrifum, tímann sem þau vara og hvort þau ganga til baka og niðurstöður úr krufningu.

3. SKÝRSLUGJÖF**3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni eftir því sem við á:

Prófunarefni:

- eðliseiginleikar, hreinleiki og, ef við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar (þ.m.t. breyting úr einu myndbrigði í annað),
- gögn til sanngreiningar, þ.m.t. CAS-númer.

Burðarefni (ef við á):

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

- tegund/stofn dýra,
- örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,
- fjöldi, aldur og kyn dýranna (ásamt forsendum fyrir því að nota karldýr í stað kvendýra),
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunarskilyrði:

- ítarlegar upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins, þ.m.t. um eðlisástand efnisins sem er gefið,
- nákvæmar upplýsingar um inngjöf prófunarefnisins, þ.m.t. um skammtastærðir og tíma inngjafar,
- nákvæmar upplýsingar um gæði fódurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fódurs og uppruni vatns),
- forsendur fyrir vali á upphafsskammti.

Niðurstöður:

- töflusetning gagna yfir svörun eftir skammtastærð, fyrir hvert dýr (þ.e. dýr sem sýna merki um eiturhrif, þ.m.t. dauðsföll, eðli áhrifanna, hve alvarleg þau eru og hve lengi þau vara),
- töflusetning gagna yfir líkamsþyngd og breytingar á líkamsþyngd,
- þyngd hvers dýrs daginn sem þeim er gefinn skammturinn, vikulega eftir það og þegar þau drepast eða þeim er lógað,
- dauðadagur og dauðastund ef dýrin hafa drepist áður en átti að lóga þeim,
- hvenær merki um eiturhrif koma fram og hvort eiturhrifin ganga til baka, fyrir hvert dýr,
- niðurstöður krufningar og vefjameinafræðilegar niðurstöður fyrir hvert dýr, liggi þær fyrir.

Umræða og túlkun niðurstaðna.

Ályktanir.

4. **HEIMILDASKRÁ**

- 1) Roll R., Höfer-Bosse Th. og Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett., Suppl.* 31, 86
- 2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. og Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336–341.
- 3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. og Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559–610
- 4) Diener W., Mischke U., Kayser D. og Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729–734.
- 5) Diener W. og Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, 129–134
- 6) Schlede E., Mischke U., Roll R. og Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method . An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455–470.
- 7) Schlede E., Mischke U., Diener W. og Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659–670.
- 8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- 9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- 10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, 2. hluti, bls. 11 [[http:// webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html](http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html)]
- 11) Lipnick R.L., Cotruvo, J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J.A. og Myers R.C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223–231.
- 12) Chan P.K. og A.W. Hayes. (1994). 16. kafli. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, ritstj. Raven Press, Ltd., New York, USA.“

*I. VIÐAUKI***PRÓFUNARAÐFERÐ SEM NOTA SKAL FYRIR HVERN UPPHAFSSKAMMT***ALMENNAR ATHUGASEMDIR*

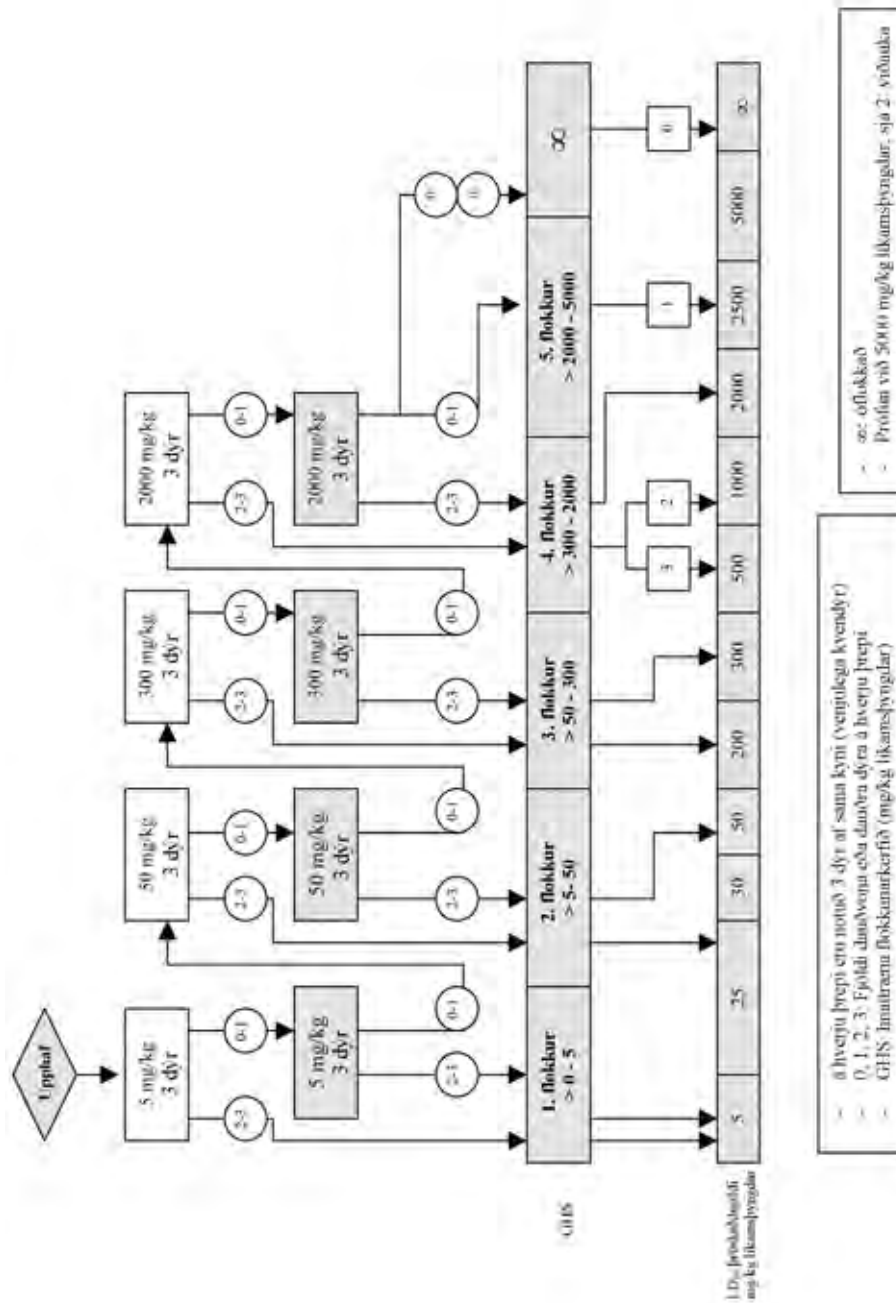
Þær ólíku prófunaraðferðir, sem lýst er í þessum viðauka, eru lýsing á því hvernig framkvæmd prófunar skal háttað fyrir hvern upphafsskammt.

- 1. viðauki A: Upphafsskammtur er 5 mg/kg líkamsþyngdar
- 1. viðauki B: Upphafsskammtur er 50 mg/kg líkamsþyngdar
- 1. viðauki C: Upphafsskammtur er 300 mg/kg líkamsþyngdar
- 1. viðauki D: Upphafsskammtur er 2 000 mg/kg líkamsþyngdar

Framkvæmd prófunar er sýnd með örvunum og fer eftir því hve mörg dýr drepast eða eru aflífud af mannúðar-ástandum.

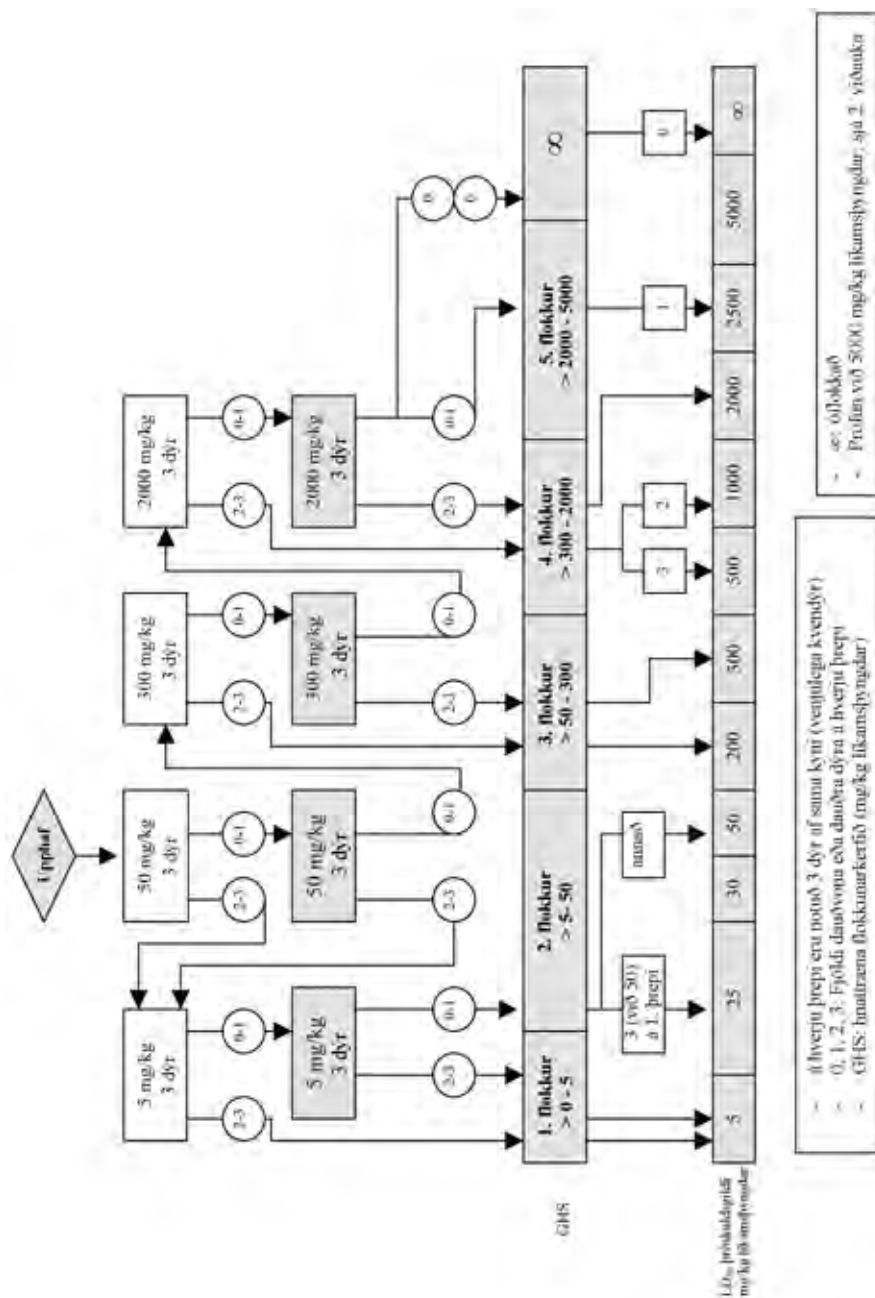
I. VIDAUKI A

PRÓFUNARADFÆRÐ MED UPPHAFSSKAMMTINUM 5 MG/KG LÍKAMSPYNGDAR



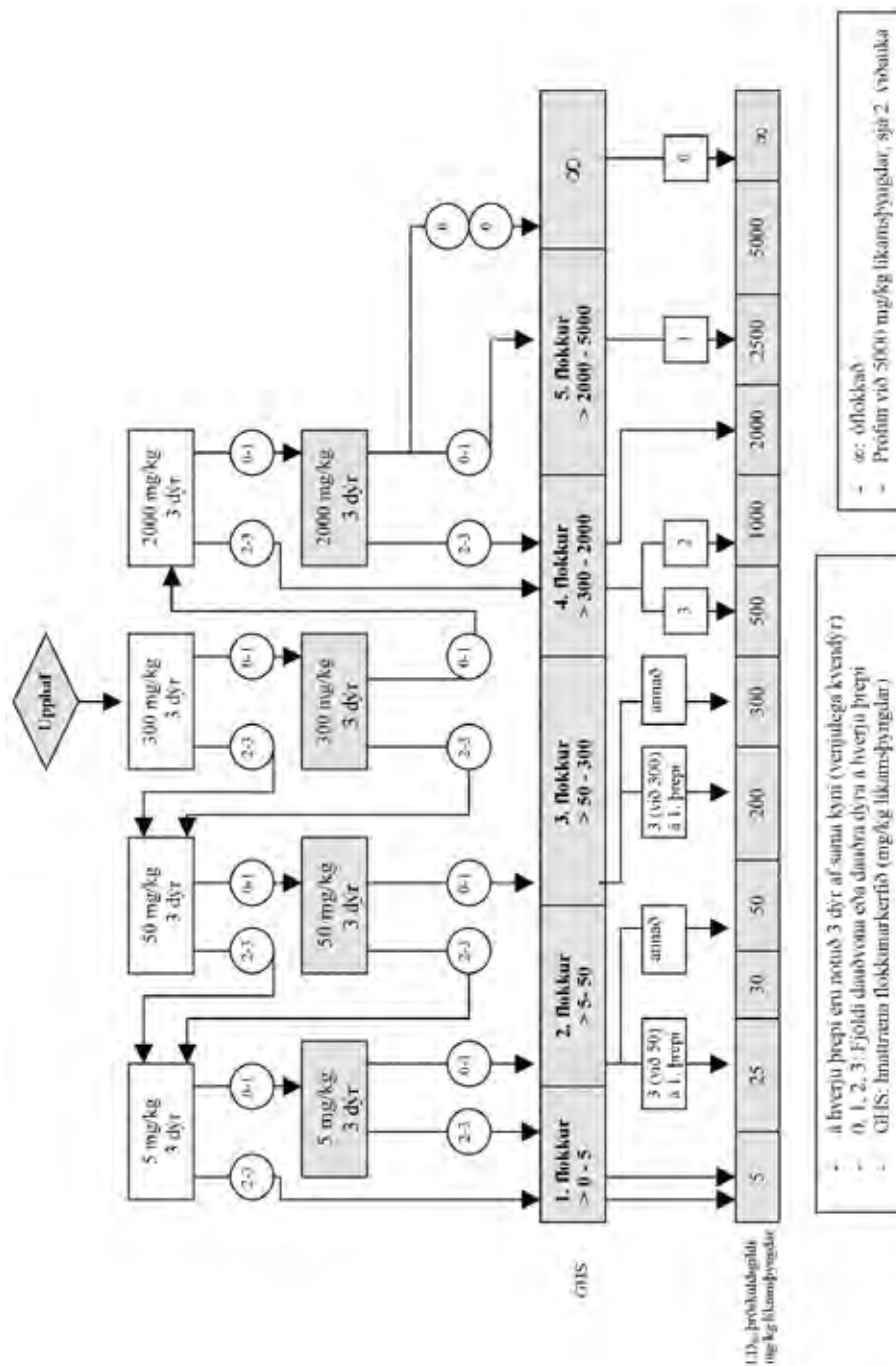
1. VIÐAUKI B

PRÓFUNARÆFERÐ MED UPPIAFSSKAMMTINUM 50 MG/KG LÍKAMSÞYNGDAR



1. VIDAUKI C

PRÓFUNARADFERÐ MED UPPIHAFSSKAMMTINUM 300 MG/KG LÍKAMSPYNGDAR



2. VIÐAUKI

VIÐMIÐANIR FYRIR FLOKKUN PRÓFUNAREFNA SEM ERU TALIN HAFHA HÆRRI LD₅₀-GILDI EN 2 000 MG/KG OG EKKI ÞARF AÐ PRÓFA

Viðmiðunum fyrir hættuflokk 5 er ætlað að auðvelda sanngreiningu prófunarefna sem tiltölulega lítil hættu er á að hafi bráð eiturrhif en geta við tilteknar aðstæður verið hættuleg viðkvæmum þýðum. Talið er að LD₅₀-gildi þessara efna við inngjöf um munn eða áburð á húð sé á bilinu 2000 – 5000 mg/kg eða sambærilegir skammtar fyrir aðrar íkomuleiðir. Prófunarefnið skal flokka í hættuflokk sem er skilgreindur með: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (í 5. flokki skv. GHS) í eftirfarandi tilvikum:

- a) ef það er felld undir þennan flokk samkvæmt einhverju prófunarkerfanna í 1. viðauka A – 1. viðauka D sakir fjölda dauðsfalla,
- b) ef til eru áreiðanlegar vísbendingar um að LD₅₀-gildið liggja á gildissviði 5. flokks eða ef aðrar dýrarannsóknir eða eiturrhif á menn benda til þess að heilbrigði manna sé alvarleg hættu búin,
- c) með framreikningi, mælingum eða mati á gögnum ef ekki er ástæða til að skipa því í hærri hættuflokk og
 - ef fyrir liggja áreiðanlegar upplýsingar sem benda til töluverðra eiturrhifa í mönnum, eða
 - dýr drepast þegar prófað er með inngjöf um munn upp að gildum sem svara til 4. flokks, eða
 - ef álit sérfræðings staðfestir veruleg, klínísk einkenni eiturrhifa þegar prófað er upp að gildum sem samsvara 4. flokki nema um sé að ræða niðurgang, hárris eða óhrjálegt útlit, eða
 - ef álit sérfræðings staðfestir áreiðanlegar upplýsingar úr öðrum dýrarannsóknum sem benda til möguleika á verulegum bráðahrifum

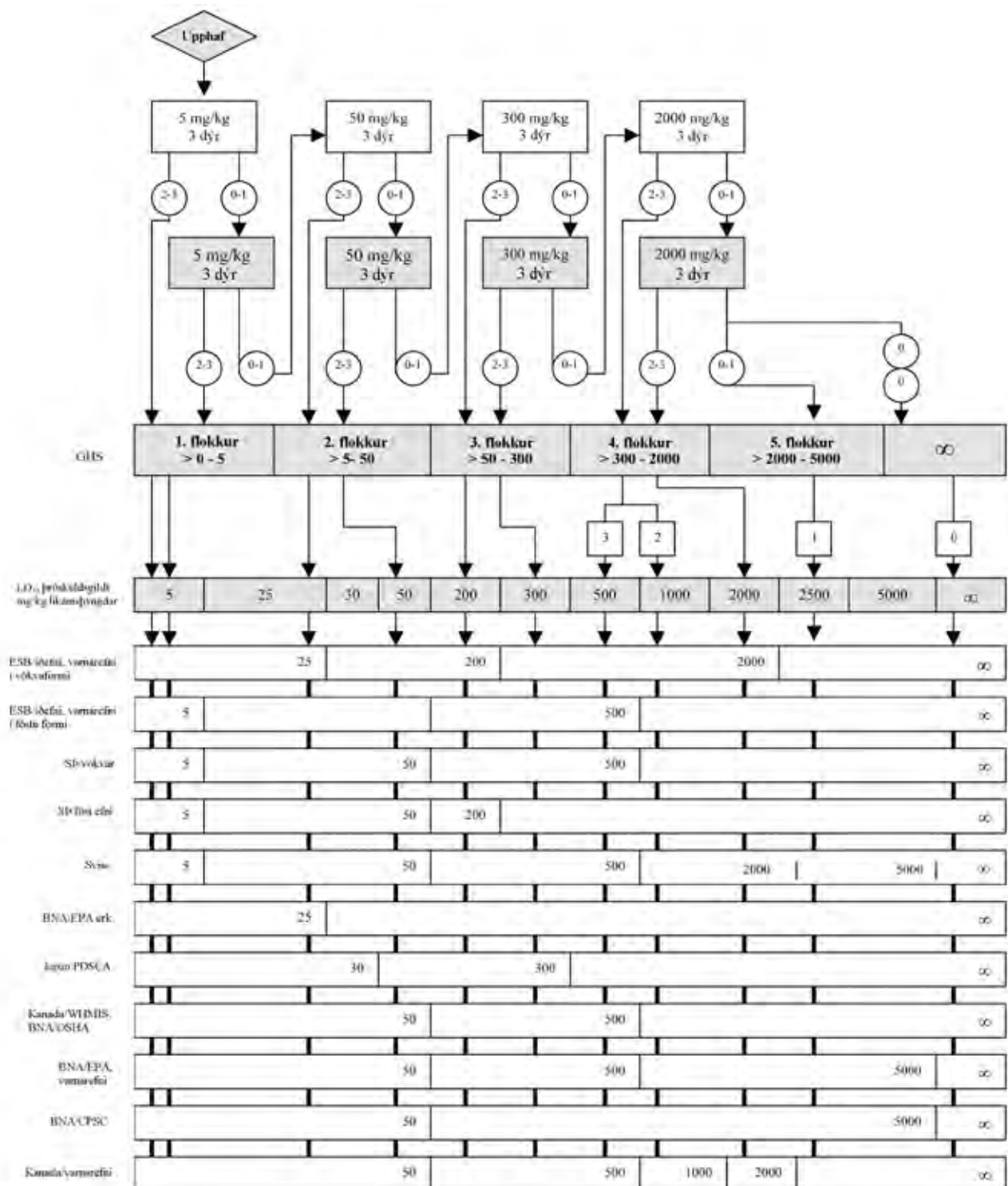
PRÓFUN MEÐ SKAMMTASTÆRDUM YFIR 2 000 MG/KG

Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að ekki séu gerðar prófanir á dýrum á sviði 5. flokks (5000 mg/kg) enda kemur það aðeins til greina þegar miklar líkur eru á því að slík prófun hafi beina þýðingu fyrir heilsuvernd manna og dýra (10. heimild). Ekki má gera neinar prófanir áfram með stærri skömmtum.

Ef prófun reynist nauðsynleg er notaður skammturinn 5000 mg/kg á aðeins einu þrepi (þ.e. þrjú dýr). Drepist fyrsta dýrið sem fær skammt er prófun haldið áfram með skammtinum 2000 mg/kg í samræmi við flæðiritin í 1. viðauka. Haldi fyrsta dýrið lífi er tveimur dýrum til viðbótar gefinn skammturinn. Drepist aðeins eitt af dýrunum þremur er gert ráð fyrir að LD₅₀-gildið sé yfir 5000 mg/kg. Drepist bæði dýrin er prófun haldið áfram með skammtinum 2000 mg/kg.

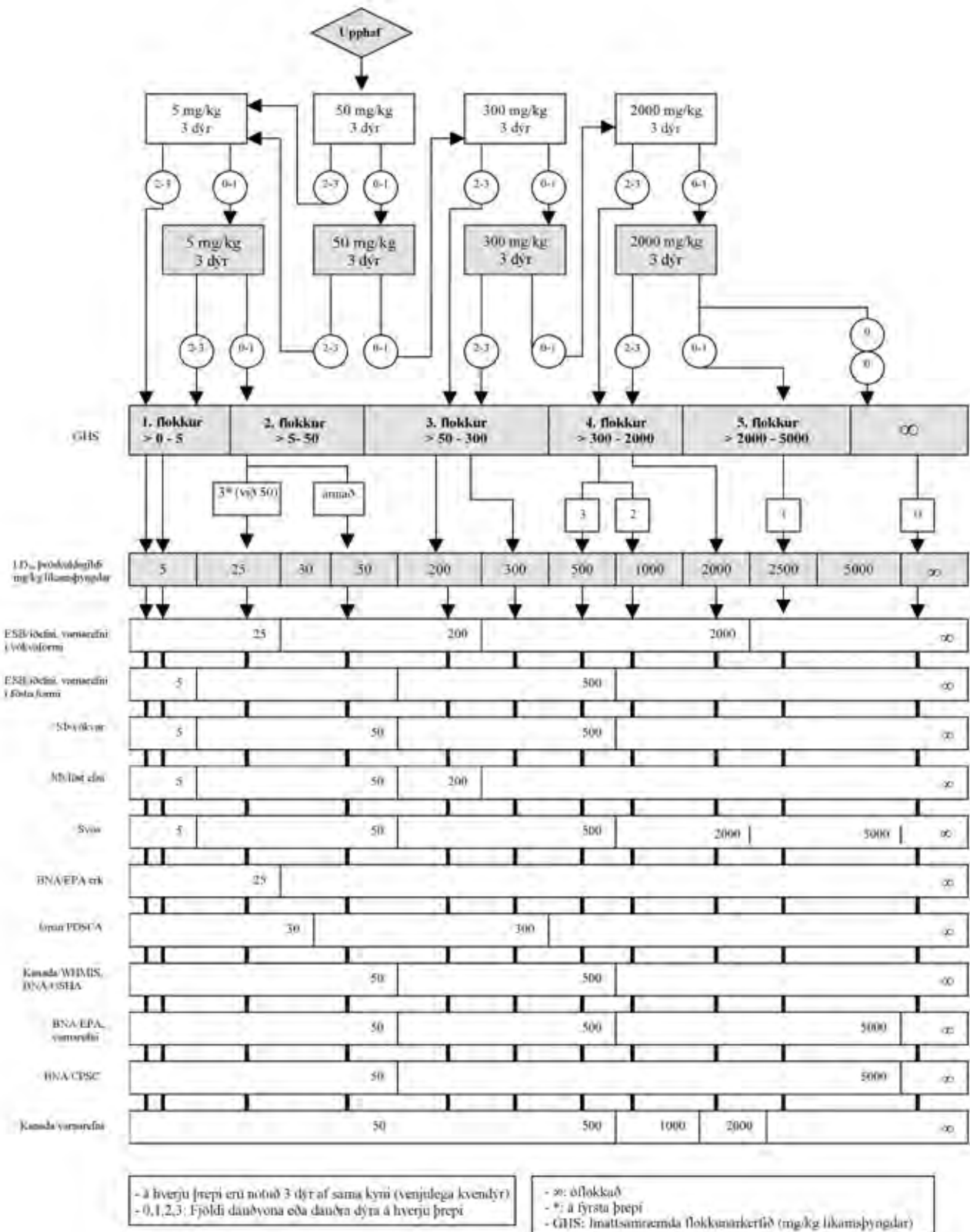
3. VIDAUKI

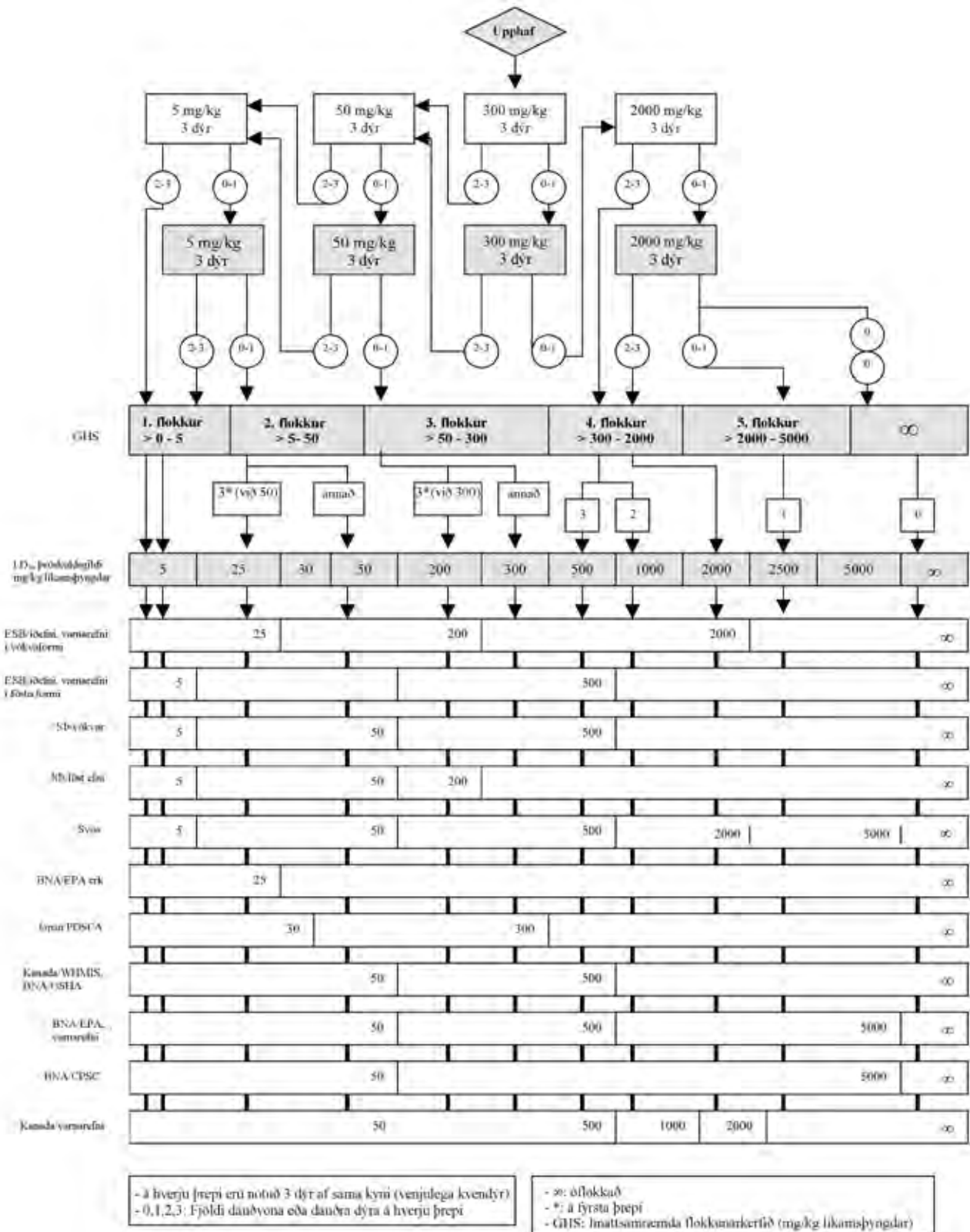
PRÓFUNARÁÐFERÐ B.1b – Leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu á aðlögunartímabili fram að fullri innleiðingu GHS (hnattsamræmda flokkunarkerfisins) (úr 8. riti í heimildaskrá)

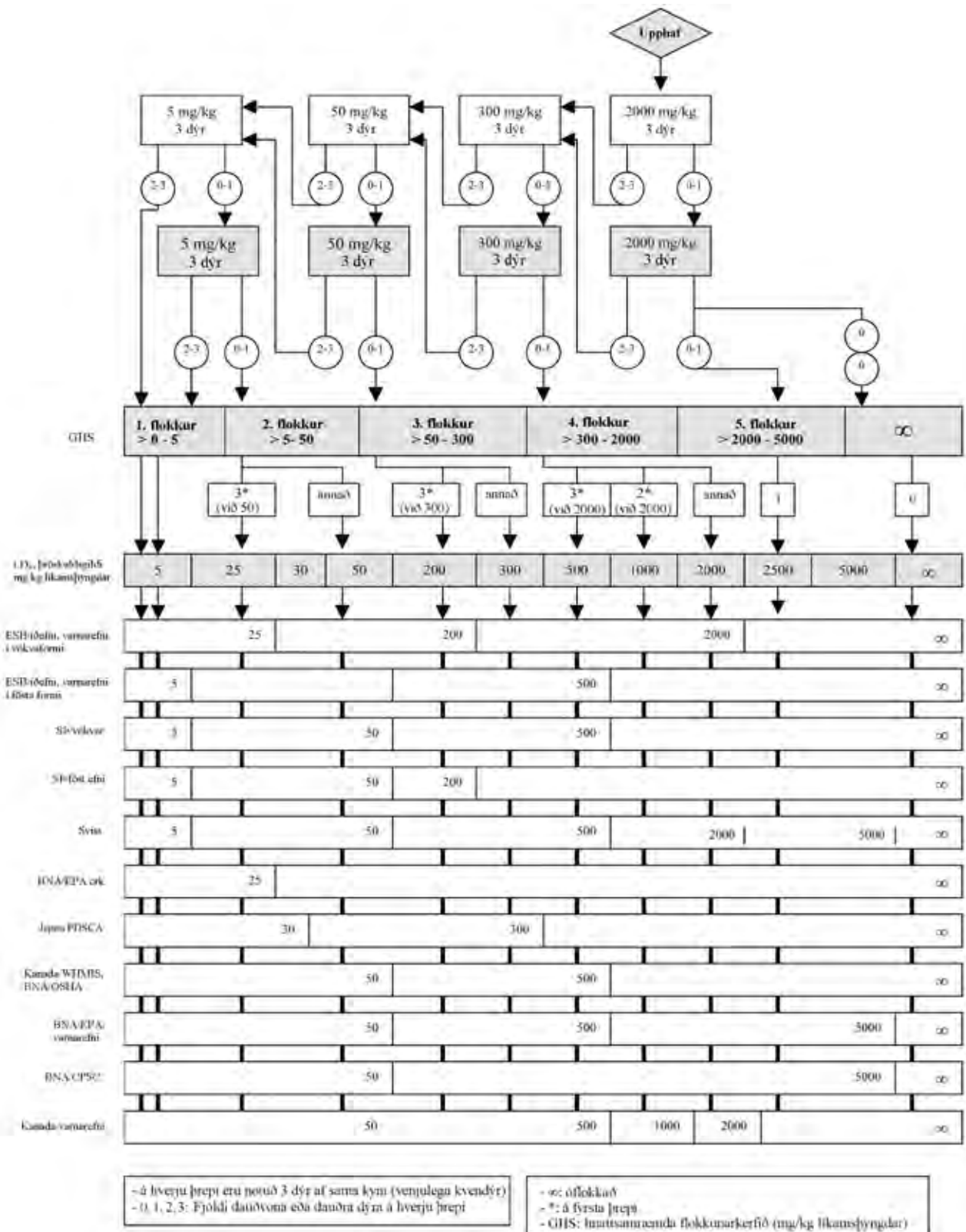


- á hverju þrepi eru notuð 3 dýr af sama kyni (venjulega kvendýr)
- 0, 1, 2, 3: Fjöldi dauðvessa eða dauðra dýra á hverju þrepi

- ∞: óflokkað
- GHS: hnattsamræmda flokkunarkerfið (mg/kg líkamspýngdar)







2. VIÐAUKI D

„B. 4. BRÁÐ EITURHRIF: HÚÐERTING/HÚÐÆTING

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD TG 404 (2002)

1.1 INNGANGUR

Við útfærslu þessarar endurbættu aðferðar var sérstaklega hugað að hugsanlegum endurbótum með tilliti til velferðar dýra og að mati á öllum fyrirbyggjandi upplýsingum um prófunarefnið til að komast hjá ónaðsýnlegum prófunum á tilraunadýrum. Ef þessi aðferð er notuð er mælt með því að fram fari greining á sönnunarvægi niðurstaðna, í fyrirbyggjandi gögnum sem málið varða, áður en hafin er prófun í lífi á ætandi eða ertandi eiginleikum efnisins samkvæmt því sem hér er lýst. Ef fyrirbyggjandi gögn eru ófullnægjandi má auka við þau með raðprófun (1. heimild). Prófunaráætlunin nær yfir fullgiltar og viðurkenndar prófanir í glasi og er birt sem viðauki við lýsinguna á þessari aðferð. Að auki er mælt með því, þar sem við á, að prófunarplástrarnir þrír í fyrstu prófuninni í lífi séu ekki settir samtímis á dýrið heldur hver á eftir öðrum.

Til að stuðla jafnt að visindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki gera prófanir í lífi fyrr en öll fyrirbyggjandi gögn, sem varða hugsanleg, ætandi eða ertandi áhrif efnisins á húð, hafa verið metin og er það gert með greiningu á sönnunarvægi niðurstaðna. Þessi gögn eru m.a. niðurstöður úr fyrirbyggjandi rannsóknum á mönnum og/eða tilraunadýrum, gögn um ætandi/ertandi eiginleika eins eða fleiri efna sem eru skyld prófunarefninu að byggingu eða blöndu af slíkum efnum, gögn sem sýna að efnið er mjög súrt eða mjög basískt (2. og 3. heimild) og niðurstöður úr fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi eða utan lífs (4. og 5. heimild og heimild 5a). Greiningin ætti að draga úr nauðsyn þess að gera prófun í lífi á ætandi/ertandi eiginleikum efna ef þegar liggja fyrir fullnægjandi niðurstöður úr öðrum rannsóknum á efnum að því er varðar þessa tvo endapunkta.

Æskileg raðprófunaráætlun, sem felur í sér fullgiltar og viðurkenndar prófanir í glasi eða utan lífs á ætandi/ertandi eiginleikum, er birt sem viðauki við lýsinguna á þessari aðferð. Vinnuhópur Efnahags- og framfarastofnunarinnar (6. heimild) þróaði áætlunina sem fékk meðmæli allra í hópnum og hún hefur verið samþykkt sem ráðlögð prófunaráætlun í hnattsamræmda kerfinu til flokkunar á iðefnum (GHS) (7. heimild). Mælt er með því að prófunaráætluninni sé fylgt áður en prófun í lífi hefst. Þegar um er að ræða ný efni er mælt með þrepskiptri prófunaraðferð við öflun trausta, visindalegra gagna um ætandi/ertandi eiginleika efnisins. Þegar gögn um húðættandi/húðertandi eiginleika fyrirbyggjandi efna eru ófullnægjandi skal nota áætlunina til að fylla í eyðurnar þar sem gögn vantar. Ef vikið er frá prófunaráætlun eða aðferð eða ef ákveðið er að nota ekki þrepskipta prófunaraðferð ber að rökstyðja það.

Ef ekki er hægt að ákvarða ætandi eða ertandi eiginleika með greiningu á sönnunarvægi niðurstaðna í samræmi við raðprófunaráætlunina kemur til greina að nota prófun í lífi (sjá viðaukann).

1.2 SKILGREININGAR

Húðerting: skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefnið hefur verið á húðinni í allt að 4 klukkustundir og getur gengið til baka.

Húðæting: er varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar, hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

1.3 GRUNDTVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Efnið, sem prófa á, er borið í einum skammti á húð tilraunadýrs og eru ómeðhöndluð svæði á húð dýrsins notuð til samanburðar. Umfang ertingar eða ætingar er ákvarðað og gefið stig af kvarða með tilteknu stærðarbili og lýst frekar til að unnt sé að meta áhrifin til fulls. Rannsóknin þarf að ná yfir svo langan tíma að unnt sé að meta hvort áhrifin, sem vart verður, geti gengið til baka eða séu varanleg.

Dýr, sem sýna merki um mikla og viðvarandi þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar, skulu aflífuð á mannúðlegan hátt, og efnið skal metið í samræmi við það. Í 8. riti í heimildaskrá eru tilgreindar viðmiðanir fyrir ákvörðun um að aflífa dauðvona og sárþjád dýr á mannúðlegan hátt.

1.4 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1 Undirbúningur fyrir prófun í lífi

1.4.1.1 Val á dýrategund

Kanínuhvítingi er ákjósanlegasta tilraunadýrið og skal nota heilbrigð, ung, fullvaxin dýr. Ef notuð er önnur dýrategund skal það rökstutt.

1.4.1.2 Undirbúningur dýra

Um það bil 24 klukkustundum fyrir prófun skal feldurinn á hrygg dýranna snöggekklipptur. Varast ber að skaða húðina og skal einungis nota dýr með heilbrigða og óskaddaða húð.

Á sumum kanínustofnum er feldurinn þéttastur á afmörkuðum blettum sem eru mest áberandi á ákveðnum tímum árs. Ekki skal nota þessa bletti við prófun.

1.4.1.3 Aðbúnaður og fóðrun

Dýrin skulu vera hvert í sínu buri. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 ± 3 °C þegar um kanínur er að ræða. Þótt hlutfallslegur raki eigi að vera minnst 30% og helst ekki meiri en 70%, nema við þríf á vistarverunum, er kjörraki 50 – 60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótáknmörkuðu drykkjarvatni.

1.4.2 Framkvæmd prófunar

1.4.2.1 Prófunarefnið borið á

Prófunarefnið skal borið á lítið húðsvæði (um það bil 6 cm²) og hulið með grisju, sem haldið er fastri með plástri sem veldur engri ertingu. Ef ekki er unnt að bera efnið beint á (t.d. ef prófunarefnið er fljótandi eða maukkennt) skal setja prófunarefnið í grisjuna og leggja hana síðan á húðina. Grisjunni skal haldið í lauslegri snertingu við húðina með hentugum, hálfloftþéttum umbúðum allan váhrifatímenn. Ef prófunarefnið er sett í grisjuna skal festa hana við húðina þannig að efnið sé í náinni snertingu við húðina og dreifist jafnt á hana. Koma skal í veg fyrir að dýrið nái til grisjunnar og að prófunarefnið berist ofan í það eða að dýrið andi efninu að sér.

Fljótandi prófunarefni eru yfirleitt notuð óþynnt. Ef prófuð eru föst efni (finmulin ef það er talið nauðsynlegt) er prófunarefnið vætt með minnsta magni af vatni (eða öðru heppilegu burðarefni ef þess er þörf) sem nægir til að tryggja góða snertingu við húðina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn mega þau aðeins hafa lágmarksáhrif á húðertingarmátt prófunarefnisins.

Við lok váhrifatímans, sem er venjulega 4 klukkustundir, skal, eftir því sem unnt er, fjarlægja eftirstöðvar prófunarefnisins með vatni eða hentugu leysiefni og forðast að breyta framkallaðri svörun eða skaða húðþekjuna.

1.4.2.2 Skammtastærð

Á prófunarstaðinn eru bornir 0,5 ml af vökva eða 0,5 g af föstu eða maukennu efni.

1.4.2.3 Upphafsprófun (húðertingar-/húðætingarprófun í lífi á einu dýri)

Eindregið er mælt með því að prófun í lífi sé aðeins gerð í upphafi með einu dýri, einkum ef grunur leikur á um að efnið geti haft ætandi áhrif. Þetta er í samræmi við raðprófunaráætlunina (sjá 1. viðauka).

Hafi efni verið dæmt ætandi á grundvelli greiningar á sönnunarvægi niðurstaðna er ekki þörf á frekari prófunum á dýrum. Fyrir flest efni, sem grunur leikur á að séu ætandi, er yfirleitt ekki þörf á frekari prófun í lífi. Í þeim tilvikum þar sem talin er þörf á frekari gögnum vegna ófullnægjandi niðurstaðna er þó heimilt að framkvæma takmarkaðar prófanir á dýrum með eftirfarandi aðferð: allt að þrjár prófunargrisjur eru settar á dýrið hver á eftir annarri. Fyrsta grisjan er fjarlægð eftir þrjár mínútur. Verði ekki vart ákaftrar svörunar í húðinni er önnur grisja sett á og fjarlægð að klukkustund liðinni. Ef athuganir á þessu stigi benda til þess að mannúðarsjónarmið leyfi að váhrifatíminn sé allt að fjórar klukkustundir skal þriðja grisjan sett á og fjarlægð að fjórum klukkustundum liðnum og svörunin metin til stiga.

Ef ætandi áhrifa verður vart eftir einhverja þessara þriggja grisja, sem settar voru á hver á eftir annarri, skal prófun hætt tafarlaust. Verði ekki vart ætandi áhrifa þegar síðasta grisjan er fjarlægð er fylgst með dýrinu í 14 daga nema æting komi fram fyrir.

Ef talið er að prófunarefnið hafi ekki ætandi áhrif, en kunni að vera ertandi, skal hafa eina grisju á einu dýri í fjórar klukkustundir.

1.4.2.4 *Staðfestingarprófun (húðertingarprófun í lífi á fleiri dýrum)*

Verði ekki vart ætandi áhrifa í upphafsprófuninni skal staðfesta ertingarsvörun eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum til viðbótar, og skal ein grisja sett á hvort dýr, og skal váhrifatíminn vera fjórar klukkustundir. Verði vart ertingaráhrifa í upphafsprófuninni má gera staðfestingarprófun með raðbundinni aðferð eða áreita samtímis tvö dýr í viðbót. Í því undantekningartilviki að ekki sé framkvæmd upphafsprófun má meðhöndla tvö eða þrjú dýr með einni grisju á hvert dýr sem er svo fjarlægð eftir fjórar klukkustundir. Ef tvö dýr eru notuð og bæði sýna sömu svörun er frekari prófunar ekki þörf. Að öðrum kosti er þriðja dýrið prófað. Nauðsynlegt getur reynst að nota fleiri dýr ef svörunin er tvíræð.

1.4.2.5 *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið þarf að vera nógu langt til að unnt sé að meta til fulls hvort áhrifin, sem vart verður, geti gengið til baka. Tilrauninni skal þó hætt um leið og dýrið sýnir viðvarandi merki um mikinn sársauka eða þjáningu. Fylgst skal með dýrunum í allt að 14 daga eftir að grisjurnar hafa verið fjarlægðar til að ákvarða hvort áhrifin gangi til baka. Komi í ljós, áður en liðnir eru 14 dagar, að áhrifin ganga til baka skal tilrauninni strax hætt.

1.4.2.6 *Klínískar athuganir og flokkun húðsvörunar*

Dýrin skulu skoðuð með tilliti til merkja um hörundsroða og bjúg og gefin stig fyrir svörun eftir 60 mínútur og síðan 24, 48 og 72 klukkustundum eftir að grisjan hefur verið fjarlægð. Við upphafsprófun á einu dýri er prófunarstaðurinn einnig skoðaður um leið og grisjan hefur verið fjarlægð. Húðsvörunin er flokkuð og skráð samkvæmt stigagjöfnni í töflunni hér á eftir. Ef húðin hefur orðið fyrir skaða sem hvorki er hægt að flokka sem ertandi eða ætandi eftir 72 klukkustundir kann að vera nauðsynlegt að halda athugun áfram fram að 14. degi til að ákvarða hvort áhrifin gangi til baka. Til viðbótar við athugun á ertingu skal lýsa til fulls og skrá öll staðbundin eiturrhif, s.s. húðfitan minnkar og öll útbreidd, skaðleg áhrif (t.d. klínísk merki um eiturrhif og áhrif á líkamspýngd). Til greina kemur að gera vefjameinafræðilega rannsókn til að skera úr um tvíræða svörun.

Stigagjöf fyrir húðsvörun er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á stigagjöf fyrir húðsvörun, og til að aðstoða rannsóknarstofur og aðra hlutaðeigandi aðila við athuganir sínar og túlkun niðurstaðna úr þeim, þarf kenna starfsfólkinu, sem vinnur við þessar athuganir, nægilega vel á stigakerfið sem er notað (sjá töfluna hér á eftir). Myndskreyttur leiðarvisir um flokkun húðertingar og annarra vefjaskemmda gæti komið að góðum notum (9. heimild)

2. **GÖGN**

2.1 **FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA**

Rannsóknarniðurstöðurnar skulu teknar saman í töflu í endanlegri prófunarskýrslu og skal þar getið allra atriða sem talin eru upp í lið 3.1.

2.2 MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal húðertinguna til stiga í tengslum við eðli og alvarleika vefjaskemmda og hvort skemmdirnar geti gengið til baka eða ekki. Stigafjöldinn í hverju einstöku tilviki er ekki algildur mælikvarði á ertingareiginleika prófunarefnis þar eð önnur áhrif efnisins eru einnig metin. Í stað þess ber að líta á stigagjöfina í hverju einstöku tilviki sem viðmiðunargildi sem þarf að meta í samhengi við allar aðrar athuganir sem gerðar voru í rannsókninni.

Við mat á ertingarsvörun skal líta til þess hvort vefjaskemmdir í húð geti gengið til baka. Ef svörunar á borð við hármassi á höfði (blettaskalla), siggmein, vefjaauka og hrúðurmyndun gætir enn í lok 14 daga athugunartímabilsins ber að líta á prófunarefnið sem ertandi.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Rökstuðningur fyrir prófun í lífi: greining á sönnunarvægi niðurstaðna í gögnum sem lágu fyrir áður en prófun hófst, þ.m.t. niðurstöður úr raðprófunaráætlun:

- lýsing á viðeigandi gögnum sem liggja fyrir úr fyrri prófunum,
- gögn úr einstökum áföngum prófunaráætlunarinnar,
- lýsing á þeim prófunum í glasi sem fram fóru, þ.m.t. nákvæm lýsing á aðferðum sem voru notaðar og niðurstöðum sem fengust með prófunar- og viðmiðunarefnum,
- greining á sönnunarvægi niðurstaðna sem lá til grundvallar rannsókn í lífi.

Prófunarefni:

- gögn til sanngreiningar (t.d. CAS-númer, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),
- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. sýrustig, rokgirni og stöðugleiki),
- ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta í hundraðshlutum.

Burðarefni:

- tegund, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,
- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- dýrategund eða stofn dýra, og ef notuð eru önnur dýr en kanínuhvítingjar skal það rökstutt,
- fjöldi dýra af hvoru kyni,
- þyngd hvers dýrs í upphafi og við lok prófunar,
- aldur í upphafi rannsóknar,
- uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunarskilyrði:

- aðferð við undirbúning svæðis fyrir grisjuplástra,
- nákvæm lýsing á grisjuefnunum og aðferð við plástrun,
- nákvæm lýsing á tilreiðslu prófunarefnisins, hvernig það er sett á og fjarlæggt.

Niðurstöður:

- töflusetning stigagjafar fyrir ertingar-/ætingarsvörun fyrir hvert dýr á hverjum athugunartíma,
- lýsing á öllum vefjaskemmdum sem komu fram,
- lýsing í samfelldu máli á eðli og umfangi þeirrar ertingar eða ætingar, sem kom fram, og vefmeinafræðilegar niðurstöður,
- lýsing á öðrum skaðlegum, staðbundnum (t.d. minnkun húðfítu) og útbreiddum áhrifum til viðbótar við húðertingu eða húðætingu.

Umræða um niðurstöður.

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.
- 2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.
- 3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.
- 4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussel.
- 5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, bls. 483–524.
- 5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion (prófunaraðferð B.40, húðæting).
- 6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Haldin í Solna, Svíþjóð, 22. – 24. janúar 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, nóvember 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- 9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Fæst hjá skrifstofu Efnahags- og framfarastofnunarinnar].

I. TAFLA: FLOKKUN HÚÐVIÐBRAGÐA**Hörundsroði og myndun brunaskorpu**

Enginn hörundsroði	0
Örlítill hörundsroði (vart sjáanlegur)	1
Greinilegur hörundsroði	2
Hörundsroði í meðallagi eða mikill	3
Mikill hörundsroði (purpuraroði) eða brunaskorpumyndun sem hindrar flokkun hörundsroða	4

Hámarksgildi: 4

Bjúgmyndun

Enginn bjúgur	0
Örlítill bjúgur (vart sjáanlegur)	1
Lítill bjúgur (vel afmarkað svæði með greinilegri lyftingu)	2
Bjúgur í meðallagi (lyfting nemur u.þ.b. 1 mm)	3
Mikill bjúgur (lyfting er yfir 1 mm og nær út fyrir váhrifasvæðið)	4

Hámarksgildi: 4

Gera má vefjameinafræðilega rannsókn til að skera úr um tvíræða svörun.

VIDAUKI

Raðprófunaráætlun fyrir húðertingu og húðætingu

ALMENN ATRIÐI

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra er mikilvægt að nota ekki tilraunadýr að nauðsynjalausu og draga sem mest úr prófunum sem líklegt er að kalli fram mikla svörum hjá dýrum. Allar upplýsingar um efni sem varða húðætingar- eða húðertingarmátt þess skulu metnar áður en hugað er að prófun í lífi. Hugsanlegt er að þegar liggi fyrir nægilegar upplýsingar til að flokka viðkomandi prófunarefni með tilliti til húðætingar- eða húðertingarmáttar þess án þess að gera þurfi prófanir á tilraunadýrum. Greining á sönnunurvægi niðurstaðna og raðprófunaráætlun dregur því úr þörfinni á prófun í lífi, einkum ef efnið er líklegt til að kalla fram mikla svörum.

Mælt er með því að fram fari greining á sönnunurvægi niðurstaðna til að meta fyrirbyggjandi upplýsingar um húðertingar- og húðætingarmátt efna og gera kleift að ákvarða hvort rétt sé að gera frekari rannsóknir, aðrar en húðrannsóknir í lífi, sem hjálpað geta við lýsingu á þeim mætti. Sé þörf á frekari rannsóknum er mælt með því að notuð sé raðprófunaráætlun til að afla viðeigandi tilraunagagna. Þegar um er að ræða efni sem hafa ekki verið prófuð áður skal nota raðprófunaráætlun við öflun þeirra gagna sem þarf til að meta húðætingar- eða húðertingarmátt efnanna. Prófunaráætlunin, sem lýst er í þessum viðauka, var samin á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (1. heimild) og síðar staðfest og aukin fyrir samræmda og samþætta kerfið til hættuflokkunar á áhrifum iðefna á heilbrigði manna og umhverfið, samþykkt á 28. sameiginlega fundi iðefnanefndar og iðefnavinnuhóps stofnunarinnar í nóvember 1998 (2. heimild).

Þótt þessi raðprófunaráætlun sé ekki órofa hluti af prófunaraðferð B.4 er hún sú áætlun sem mælt er með til að ákvarða húðertingar- eða húðætingareiginleika. Áætlunin felur bæði í sér bestu starfsvenjur og siðareglur fyrir prófun í lífi á húðertingu eða húðætingu. Í lýsingu á prófunaraðferðinni eru gefnar leiðbeiningar um framkvæmd prófana í lífi og tilgreind í stuttu máli þau atriði sem þarf að afgreiða áður en hafist er handa við slíka prófun. Í áætluninni er aðferð til að meta fyrirbyggjandi gögn um húðertingar- eða húðætingareiginleika prófunarefna og stigskipt aðferð til að afla viðeigandi gagna um efni sem útheimta frekari rannsóknir eða sem engar rannsóknir hafa verið gerðar á. Einnig er mælt með því að við tilteknaðar aðstæður séu gerðar fullgiltar og viðurkenndar prófanir í lífi eða utan lífs á húðæti eða húðertandi eiginleikum.

LÝSING Á MATS- OG PRÓFUNARÁÆTLUN

Áður en gerðar eru prófanir, sem eru hluti af raðprófunaráætlun (mynd), skal meta allar fyrirbyggjandi upplýsingar til að ákvarða þörfina á húðprófun í lífi. Vera kann að afla megi mikilvægra upplýsinga með mati á einstökum færibreytum (t.d. mjög hátt eða mjög lágt sýrustig) en þó ber að skoða allar fyrirbyggjandi upplýsingar í heild sinni. Öll viðeigandi gögn um áhrif efnisins, sem um er að ræða, eða áhrif hliðstæðra efna skulu metin þegar tekin er ákvörðun sem byggist á sönnunurvægi niðurstaðna og skal rökstyðja ákvörðunina. Leggja skal megináherslu á fyrirbyggjandi gögn um áhrif efnisins á menn og dýr og því næst á útkomuna úr prófun í glasi og utan lífs. Reynt skal eftir megni að komast hjá rannsóknum í lífi á ætandi efnum. Eftirfarandi atriði skulu m.a. tekin til greina í prófunaráætluninni:

Mat á fyrirbyggjandi gögnum um áhrif á menn og dýr (1. þrep). Fyrst skal skoða fyrirbyggjandi gögn um áhrif á menn, t.d. úr klínískum rannsóknum og rannsóknum á starfsumhverfi, og ferilskýrslur og/eða gögn um áhrif á dýr, t.d. úr eiturhrifarannsóknum þar sem beitt er váhrifum á húð í eitt skipti eða endurteknum váhrifum, þar eð þessi gögn veita beinar upplýsingar um áhrif á húð. Ekki þarf að rannsaka efni í lífi ef um er að ræða efni með þekkta ertingar- eða ætingareiginleika og efni sem ljóst er að eru hvorki ætandi né ertandi.

Greining á venslum efnabyggingar og virkni (2. þrep). Skoða skal niðurstöður úr prófunum á efnum með skylda byggingu, ef þær eru fyrir hendi. Ef fyrir liggja gögn um efni með skylda byggingu eða blöndur slíkra efna úr prófunum á mönnum og/eða dýrum og gögnin nægja til að sýna húðætingar- eða húðertingarmátt þeirra má ganga út frá því að prófunarefnið framkalli sömu svörum. Þegar svo er þarf e.t.v. ekki að prófa prófunarefnið. Neikvæð gögn úr rannsóknum á efnum með skylda efnabyggingu, eða blöndu slíkra efna, eru ekki næg sönnun, samkvæmt raðprófunaráætluninni, fyrir því að tiltekið efni sé ekki ætandi eða ertandi. Nota skal fullgiltar og viðurkenndar aðferðir til að sanngreina bæði húðætingar- og húðertingarmátt.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar og hvarfgirni (3. þrep). Efni með mjög hátt eða mjög lágt sýrustig, t.d. $\leq 2,0$ og $\geq 11,5$, geta haft mikil, staðbundin áhrif. Ef óvenjuhátt eða -lágt sýrustig er notað sem mælikvarði á húðæti eiginleika efnis er eðlilegt að skoða einnig sýru- eða basaforða eða jafnarýmd efnisins (buffering capacity) (3. og 4. heimild). Ef jafnarýmdin gefur til kynna að efnið sé ekki húðæti skal gera frekari prófanir til að staðfesta þetta og helst skal nota fullgiltar og viðurkennda prófun í glasi eða utan lífs (sjá 5. og 6. þrep).

Eiturhrif á húð (4. þrep). Ef sannað hefur verið að tiltekið iðefni sé mjög eitruð við upptöku gegnum húð getur reynst ógerlegt að framkvæma rannsókn í lífi á húðertingu eða húðætingu þar eð það magn prófunarefnis, sem er venjulega borið á, kann að vera meira en sá skammtur sem telst mjög eitruður og valda því að dýrin drepast eða líða miklar þjáningar.

Hafi áður verður gerð rannsókn með kanínuhvítungjum á eiturhrifum á húð upp að háskammtinum 2000 mg/kg miðað við líkamsþyngd eða stærri skammti og engin húðerting eða húðæting komið í ljós er auk þess e.t.v. ónauðsynlegt að gera frekari prófanir á húðertingu eða húðætingu. Við mat á niðurstöðum úr fyrri prófunum á bráðum eiturhrifum á húð þarf að huga að ýmsum atriðum. Upplýsingar um vefjaskemmdir geta t.d. verið ófullnægjandi. Ef til vill voru prófanirnar og athuganirnar gerðar á annarri dýrategund en kaninum en næmi í svörun getur verið mjög mismunandi eftir dýrategundum. Einnig getur verið að prófunarefnið, sem var borið á dýrin, hafi ekki verið í heppilegu formi fyrir mat á húðertingu eða húðætingu (t.d. þynning efnisins við prófun á eiturhrifum á húð (5. heimild). Í þeim tilvikum, þar sem gerðar hafa verið vel hannaðar og vel unnar rannsóknir með kaninum á eiturhrifum á húð, má þó telja neikvæðar niðurstöður nægilega sönnun fyrir því að efnið sé hvorki ætandi né ertandi.

Niðurstöður úr prófunum í glasi eða utan lífs (5. og 6. þrep). Ekki þarf að prófa efni á dýrum ef sýnt hefur verið fram á í fullgiltum og viðurkenndum prófunum í lífi eða utan lífs (6. og 7. heimild), sem voru sérstaklega hannaðar til að meta þessi áhrif, að þau hafi ætandi eða mjög ertandi eiginleika. Ganga má út frá því að slík efni hafi svipuð áhrif í lífi.

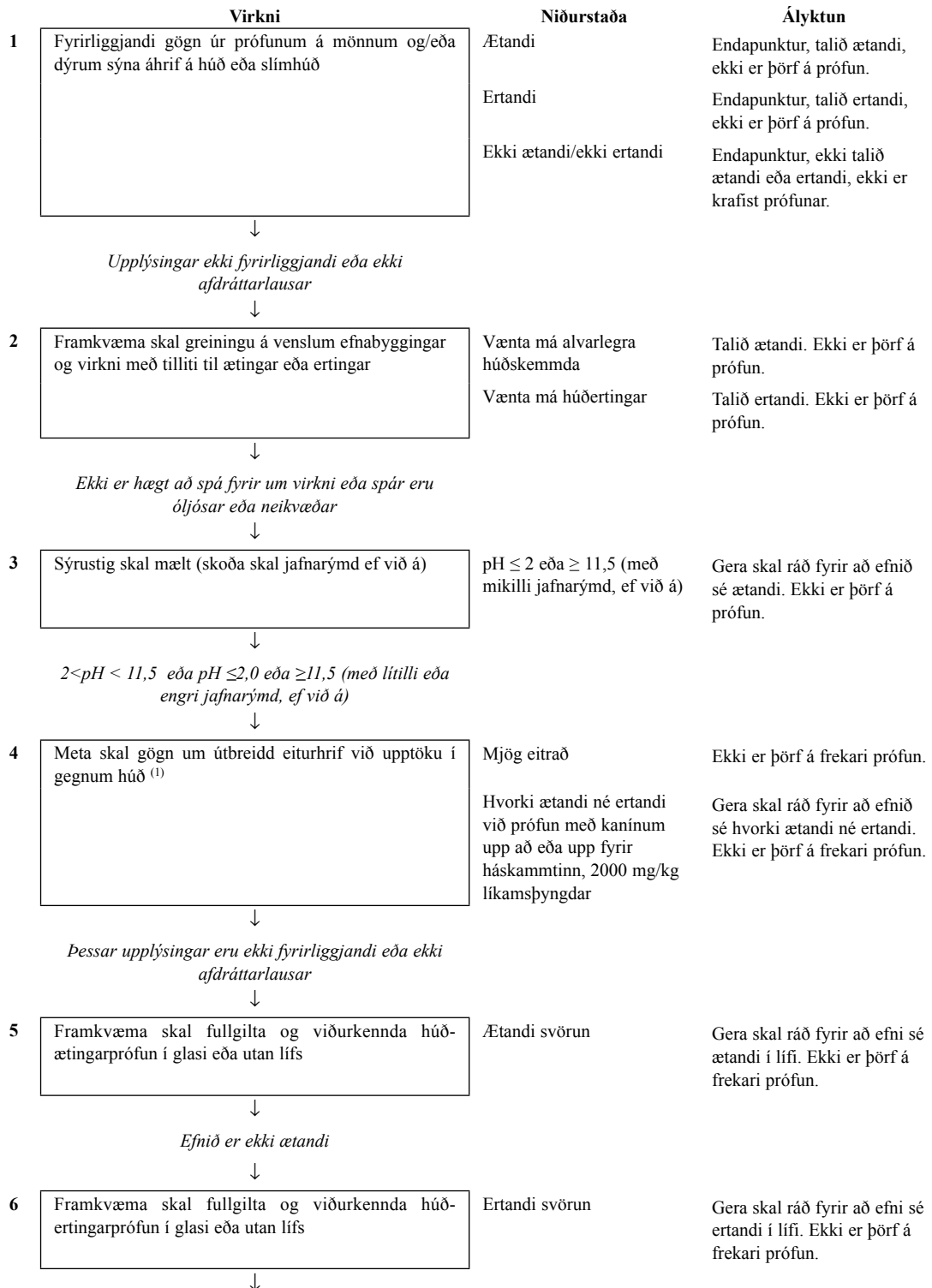
Prófun í lífi á kaninum (7. og 8. þrep). Ef ákveðið er, eftir mat á sönnunarvægi niðurstaðna, að framkvæma prófun í lífi skal byrja á upphafsprófun þar sem notað er eitt dýr. Ef niðurstöður úr þessari prófun sýna að efnið er húðætandi skal ekki gera frekari prófanir. Verði ekki vart ætandi áhrifa í upphafsprófuninni skal staðfesta ertingarsvörun eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum til viðbótar þar sem váhrifatíminn er fjórar klukkustundir. Verði ertingaráhrifa vart í upphafsprófuninni má gera staðfestingarprófun með raðbundinni aðferð eða með því að láta tvö dýr til viðbótar verða samtímis fyrir váhrifum.

HEIMILDASKRÁ

- 1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Haldin í Solna, Svíþjóð, 22. – 24. janúar 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, nóvember 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdail D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709–720.
- 4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) bls. 19–26.
- 5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli og Howard I. Maibach (ritstjórar): Dermatotoxicology. Fimmta útgáfa, ISBN 1-56032-356-6, 31. kafli, 411–436.
- 6) Testing Method B.40 (prófunaraðferð B.40).
- 7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Holzhutter, H.G. og Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, bls. 483–524.

MYND

PRÓFUNAR- OG MATSÁÆTLUN FYRIR HÚÐERTINGU/HÚÐÆTINGU

⁽¹⁾ má íhuga á undan 2. og 3. þrepi.

*Fullgiltar aðferðir til prófunar í glasi eða utan lífs
á húðertingu liggja ekki fyrir enn sem komið er eða
efnið er ekki ertandi*



- | | | | |
|---|---|------------------------|--|
| 7 | Framkvæma skal upphafsprófun í lífi með kanínu og skal aðeins nota eitt dýr | Alvarlegar húðskemmdir | Talið ætandi. Ekki er þörf á frekari prófun. |
|---|---|------------------------|--|



Engar alvarlegar skemmdir



- | | | | |
|---|--|--|--|
| 8 | Framkvæma skal staðfestingarprófun með einu eða tveimur dýrum til viðbótar | Ertandi eða ætandi

Hvorki ætandi né ertandi | Talið ætandi eða ertandi. Ekki er þörf á frekari prófun.

Hvorki talið ætandi né ertandi. Ekki er þörf á frekari prófun. |
|---|--|--|--|

“

2. VIÐAUKI E

„B.5. BRÁÐ EITURHRIF: AUGNERTING/AUGNÆTING

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD TG 405 (2002)

1.1 INNGANGUR

Við útfærslu þessarar endurbættu aðferðar var sérstaklega hugað að því hvort unnt væri að bæta hana með því að meta allar fyrirbyggjandi upplýsingar um prófunarefnið til að komast hjá ónaðsynlegum prófunum á tilraunadýrum og taka þannig tillit til velferðar dýra. Ef þessi aðferð er notuð er mælt með því að fram fari greining á sönnunurvægi niðurstaðna (1. heimild) í öllum fyrirbyggjandi gögnum sem málið varða áður en hafin er prófun í lífi á bráðri augnertingu eða augnætingu samkvæmt því sem hér er lýst. Ef fyrirbyggjandi gögn eru ófullnægjandi er mælt með því að aukið sé við þau með raðprófun (2. og 3. heimild). Prófunaráætlunin nær yfir prófanir á fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi og er birt sem viðauki við lýsinguna á prófunaraðferðinni. Að auki er mælt með því að gerð sé prófun í lífi á húðertingu/húðætingu til að spá fyrir um augnætingu áður en hugað er að augnprófun í lífi.

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki huga að prófun í lífi fyrir en búið er að meta öll fyrirbyggjandi gögn sem varða hugsanleg augnætandi eða augnertandi áhrif efnisins og er það gert með greiningu á sönnunurvægi niðurstaðna. Þessi gögn eru m.a. niðurstöður úr fyrirbyggjandi rannsóknum á mönnum og/eða tilraunadýrum, gögn um ætandi/ertandi eiginleika eins eða fleiri efna með skylda byggingu eða gögn um blöndur slíkra efna, gögn sem sýna að efnið er mjög súrt eða mjög basískt (4. og 5. heimild) og niðurstöður úr fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi eða utan lífs á húðætingu og húðertingu (6. heimild og heimild 6a). Rannsóknirnar kunna að hafa farið fram á undan greiningu á sönnunurvægi niðurstaðna eða verið afleiðing slíkrar greiningar.

Að því er viðvíkur sumum efnum getur slík greining sýnt að þörf er á rannsóknum í lífi á augnætingar- eða augnertingarmætti efnisins. Í öllum slíkum tilvikum skal helst framkvæma rannsókn í lífi á áhrifum efnisins á húð og meta þessi áhrif í samræmi við prófunaraðferð B.4 (7. heimild) áður en til greina kemur að gera augnprófun í lífi. Greining á sönnunurvægi niðurstaðna og raðprófunaráætlun ætti að draga úr þörfinni á prófun í lífi á augnætandi/augnertandi eiginleikum efna ef þegar liggja fyrir fullnægjandi niðurstöður úr öðrum rannsóknum á efnunum að því er varðar þessa eiginleika. Ef ekki er unnt að ákvarða augnætingar- eða augnertingarmátt með raðprófunaráætlun, jafnvel þótt gerð hafi verið rannsókn í lífi á húðætingu og húðertingu, ber að framkvæma augnætingar- eða augnertingarprófun í lífi.

Æskileg raðprófunaráætlun, sem felur í sér fullgiltar prófanir í glasi eða utan lífs á ætandi/ertandi eiginleikum, er birt í viðaukanum við lýsinguna á þessari prófunaraðferð. Vinnuhópur Efnahags- og framfarastofnunarinnar (8. heimild) þróaði áætlunina sem fékk meðmæli allra í hópnum og hún hefur verið samþykkt sem ráðlögð prófunaráætlun í hnattsamræmda kerfinu til flokkunar á iðefnum (GHS) (9. heimild) Mælt er með því að prófunaráætluninni sé fylgt áður en prófun í lífi hefst. Þegar um er að ræða ný efni er mælt með þrepskiptri prófunaraðferð við öflun traustra, vísindalegra gagna um ætingu/ertingu efnisins. Ef gögn um ætandi eða ertandi áhrif fyrirbyggjandi efna á húð eða augu eru ófullnægjandi skal nota áætlunina til að fylla í eyðurnar þar sem gögn vantar. Ef vikið er frá prófunaráætlun eða aðferð eða ef ákveðið er að nota ekki þrepskipta prófunaraðferð ber að rökstyðja það.

1.2 SKILGREININGAR

Augnerting: breytingar, sem eiga sér stað í auga eftir að prófunarefni hefur verið borið í það, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags.

Augnæting: vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunarefni hefur verið borið í auga, sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags.

1.3 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Prófunarefnið er borið í einum skammti í annað auga tilraunadýrsins en ómeðhöndlaða augað er notað til samanburðar. Umfang augnertingar eða augnætingar er metið með því að gefa stig fyrir skemmdir í slímhúð, glæru (hornhimnu) og lithimnu augans af kvarða með tilteknu stærðarbili. Öðrum áhrifum á augu og skaðlegum, útbreiddum áhrifum er einnig lýst til að gefa heildarmynd af áhrifunum. Rannsóknin þarf að ná yfir svo langan tíma að unnt sé að meta hvort áhrifin geti gengið til baka eða séu varanleg.

Dýr, sem sýna merki um mikla og viðvarandi þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar, skulu aflífuð á mannúðlegan hátt, og efnið skal metið í samræmi við það. Í 10. riti í heimildaskrá eru tilgreindar viðmiðanir fyrir ákvörðun um að aflífa dauðvona og sárþjáð dýr á mannúðlegan hátt.

1.4 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1 Undirbúningur fyrir prófun í lífi

1.4.1.1 Val á dýrategund

Kanínuhvítungi er ákjósanlegasta tilraunadýrið og skal nota heilbrigð, ung, fullvaxin dýr. Ef notaðir eru aðrir stofnar eða önnur dýrategund skal það rökstutt.

1.4.1.2 Tilraunadýrin undirbúin

Innan 24 klukkustunda fyrir prófun skal skoða bæði augu allra dýra sem hafa til bráðabirgða verið valin til prófunar. Ekki skal nota dýr sem þjást af augnertingu eða augngalla eða hafa skemmda glæru fyrir.

1.4.1.3 Aðbúnaður og fóðrun

Dýrin skulu vera hvert í sínu búi. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 (± 3) °C þegar um kanínur er að ræða. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir en 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjöraki 50 – 60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

1.4.2 Prófunaraðferð

1.4.2.1 Prófunarefninu dreypt í auga

Prófunarefnið er sett í slímhúðarpoka annars augans á hverju dýri með því að toga neðra augnlokið varlega frá auganu. Augnlokunum er síðan haldið varlega saman í um það bil eina sekúndu til þess að koma í veg fyrir að efnið renni út. Ómeðhöndlaða augað er notað til samanburðar.

1.4.2.2 Skolun

Ekki má skola augu tilraunadýranna í 24 klukkustundir eftir ídreypingu með prófunarefninu nema um sé að ræða föst efni (sjá lið 1.4.2.3.2) eða ef ætandi eða ertandi áhrif koma strax fram. Eftir 24 klukkustundir má skola þau, ef ástæða þykir til.

Ekki er mælt með því að notaður sé fylgihópur dýra til að rannsaka áhrif skolunar nema það sé stutt vísindalegum rökum. Ef þörf er á fylgihópi skal nota tvær kanínur. Skilyrðin við skolun skulu skjalfest af nákvæmni, þ.e. tímasetning skolunar, samsetning og hitastig skolvökvans, hversu lengi hún varir, rúmmál og hraði ídreytingar.

1.4.2.3 Skammtastærð

1.4.2.3.1 Prófun vökvu

Við prófun á vökvum er notaður 0,1 ml skammtur. Ekki skal nota úðadælur til að setja efnið beint í augað. Þess í stað skal sprauta úðanum og láta vökvann safnast fyrir í öðru íláti og dreypta því næst 0,1 ml af honum í augað.

1.4.2.3.2 *Prófun fastra efna*

Við prófun á föstum efnum, maukennðu efni og efnisögnum skal sýnið vera 0,1 ml að rúmmáli eða í mesta lagi 100 mg að þyngd. Prófunarefnið skal mulið í fingert duft. Rúmmál fastra efna skal mælt eftir að þeim hefur verið þjappað varlega saman, t.d. með því að slá laust á mæliilátið. Ef fasta efnið hefur ekki horfið úr auga prófunardýrsins á eðlilegan hátt þegar kemur að fyrstu athugun, einni klst. eftir meðhöndlun, má hreinsa augað með saltvatni eða eimuðu vatni.

1.4.2.3.3 *Prófun úðaeftna*

Mælt er með því að öllum úðadæluvökva og úðaeftnum sé safnað í annað ílát áður en þeim er dreypt í augað. Eina undantekningin frá þessu eru efni í þrýstiúðabrúsum en ekki er hægt að safna þeim í annað ílát vegna uppufunar. Í því tilviki skal halda auganu opnu og úða prófunarefninu í augað í einni lotu, sem varir í u.þ.b. 1 sekúndu, og úr 10 cm fjarlægð beint fyrir framan augað. Fjarlægðin getur verið breytileg eftir þrýstingnum í úðabrúsanum og innihaldi hans. Þess skal gætt að úðaþrýstingurinn skaði ekki augað. Í tilteknum tilvikum þarf e.t.v. að meta möguleikann á „aflrænum“ skaða á auganu vegna þess hve kröftug úðunin er.

Meta má skammtinn úr úðabrúsanum með því að líkja eftir prófuninni á eftirfarandi hátt: efninu er úðað á vigtunarblað gegnum op sem sett er beint fyrir framan blaðið og er á stærð við kanínuauga. Þyngdaraukning blaðsins er notuð til að finna u.þ.b. það magn sem er úðað í augað. Ef efnin eru rokkgjörn má áætla skammtinn með því að vigta viðtökuilátið áður en og eftir að prófunarefnið er fjarlægt úr því.

1.4.2.4 *Upphafsprófun (augnertingar- eða augnætingarprófun í lífi á einu dýri)*

Eins og fram kom í raðprófunaráætluninni (sjá 1. viðauka) er eindregið mælt með því að gera prófun í lífi í upphafi á einu dýri.

Ef niðurstöðurnar úr þessari prófun sýna að efnið er ætandi eða mjög ertandi fyrir augað, þegar notuð er sú aðferð við framkvæmd sem lýst var, skal ekki gera frekari augnertingarprófanir.

1.4.2.5 *Staðeifylyf*

Heimilt er að nota staðeifylyf og skal tekin ákvörðun um það í hverju tilviki fyrir sig. Ef greining á sönnunarvægi niðurstaðna sýnir að efnið getur valdið sársauka eða sýni upphafsprófun sársaukaviðbrögð má beita staðeifyngu áður en efnið er sett í augað. Ákveða skal tegund, styrk og skammt staðeifylyfs af nákvæmni til að tryggja að það hafi ekki áhrif á svörunina við prófunarefninu. Samanburðaraugað skal staðeifyt á samsvarandi hátt.

1.4.2.6 *Staðfestingarprófun (augnertingarprófun í lífi á fleiri dýrum til viðbótar)*

Komi ekki fram ætingarverkun í upphafsprófuninni skal staðfesta ertandi eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum. Komi fram mjög ertandi áhrif í upphafsprófun, sem benda til þess að vænta megi ákafra (óafturkallanlegra) áhrifa í staðfestingarprófuninni, er mælt með því að staðfestingarprófunin sé raðprófun með einu dýri í einu fremur en að prófa tvö dýr í einu til viðbótar. Ef ætandi eða mjög ertandi verkun kemur fram hjá seinna dýrinu er prófuninni ekki haldið áfram. Til að staðfesta ertandi svörun sem er veik eða í meðallagi þarf ef til vill að nota fleiri dýr.

1.4.2.7 *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið þarf að vera svo langt að unnt sé að meta til fulls umfang þeirra áhrifa, sem vart verður, og hvort þau ganga til baka. Sýni dýrið stöðug merki um mikinn sársauka eða þjáningu skal tilrauninni þó hætt (9. heimild) Venjulega skal fylgst með dýrinu í 21 dag eftir meðhöndlun með prófunarefninu til að ákvarða hvort áhrifin ganga til baka. Komi í ljós, áður en liðinn er 21 dagur, að áhrifin ganga til baka skal tilrauninni strax hætt.

1.4.2.7.1 *Klínískar athuganir og flokkun augnsvörunar*

Augun eru skoðuð eftir 1, 24, 48 og 72 klukkustundir frá ídreypingu prófunarefnisins. Dýrunum skal ekki haldið lengur í prófuninni en nauðsynlegt er til að afla ótvíræðra upplýsinga. Dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða þjáningu skulu aflífuð þegar í stað á mannúðlegan hátt, og efnið skal metið í samræmi við það. Aflífa skal dýr á mannúðlegan hátt hafi þau fengið eftirfarandi augnskemmdir eftir ídreypingu: gót á glæru eða umtalsverð sáramyndun er á glæru, þ.m.t. bungun, blóð í fremra hólf augans, 4. stigs ógagnsæi glæru sem varir í 48 klukkustundir, engin ljóssvörun (2. stigs lithimnusvörun) í 72 klukkustundir, sáramyndun á slímhúð augans, drep í slímhúð augans eða blikhimnu, eða myndun drepvefjar. Ástæðan er sú að venjulega ganga þessar vefjaskemmdir ekki til baka.

Ekki má aflífa dýr, sem ekki fá augnskemmdir, fyrr en þremur dögum eftir ídreypingu. Fylgst skal með dýrum með augnskemmdir, sem eru vægar eða í meðallagi, þar til augnskemmdirnar hverfa, eða í 21 dag, og skal prófuninni þá hætt. Athuganir skulu gerðar á 7., 14. og 21. degi til að ákvarða umfang skemmdanna og hvort þær séu varanlegar eða ekki.

Við hverja athugun skal skrá flokka augnsvörunar (í slímhimnu, glæru og lithimnu) (sjá 1. töflu). Einnig skal skýra frá öðrum skemmdum á auga (s.s. æðavagli á glæru og litun) eða skaðlegum, útbreiddum verkunum.

Auðvelda má athugun á svörun með því að nota stækkunargler fyrir bæði augu, handaugnslampa, augnsjá eða annað hentugt tæki. Þegar athuganir eftir 24 klukkustundir hafa verið skráðar má skoða augun nánar með aðstoð flúrskinslausnar.

Stigagjöf fyrir augnsvörun er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á stigagjöf fyrir augnsvörun og til að aðstoða rannsóknarstofur og aðra hlutaðeigandi aðila við athuganir sínar og túlkun niðurstaðna úr þeim þarf að kenna starfsfólkinu, sem vinnur við þessar athuganir, nægilega vel á stigakerfið sem er notað.

2. **GÖGN**

2.2 MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal augnertinguna til stiga í tengslum við eðli og alvarleika vefjaskemmda og hvort skemmdirnar geti gengið til baka eða ekki. Stigafjöldinn í hverju einstöku tilviki er ekki algild viðmiðun fyrir ertingareiginleika prófunarefnis þar eð önnur áhrif efnisins eru einnig metin. Í stað þess ber að líta á stigagjöf í hverju einstöku tilviki sem viðmiðunargildi enda hafa stigin enga merkingu nema þeim fylgi fullnægjandi lýsing og mat á öllum athugunum sem fram fóru.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Rökstuðningur fyrir prófun í lífi: greining á sönnunarvægi niðurstaðna í gögnum sem lágu fyrir áður en prófun hófst, þ.m.t. niðurstöður úr raðprófunaráætlun:

- lýsing á viðeigandi gögnum sem liggja fyrir úr fyrri prófunum,
- gögn úr einstökum áföngum prófunaráætlunarinnar,
- lýsing á þeim prófunum í glasi sem fram fóru, þ.m.t. nákvæm lýsing á aðferðum sem voru notaðar og niðurstöðum sem fengust með prófunar- og viðmiðunarefnum,
- lýsing á húðertingar- eða húðætingarrannsókninni í lífi sem gerð var, þ.m.t. niðurstöðurnar sem fengust,
- greining á sönnunarvægi niðurstaðna sem lá til grundvallar rannsókn í lífi.

Prófunarefni:

- gögn til sanngreiningar (t.d. CAS-númer, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),
- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. sýrustig, rokgirni, leysni, stöðugleiki og hvarfgirni við vatn),
- ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta í hundraðshlutum,
- ef notað er staðdeyfilyf: gögn til sanngreiningar, hreinleiki, tegund, skammtur og hugsanleg víxlverkun við prófunarefnið.

Burðarefni:

- auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,
- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- dýrategund eða stofn dýra og ef notuð voru önnur dýr en kanínuhvítingjar skal það rökstutt,
- aldur hvers dýrs í upphafi rannsóknar,
- fjöldi dýra af hvoru kyni í prófunar- og samanburðarhópum (eftir atvikum),
- þyngd hvers dýrs í upphafi og lok prófunar,
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Niðurstöður:

- lýsing á aðferð til að meta ertingu til stiga á hverjum athugunartíma (t.d. færanlegur raufarlampi, augnsmásjá, flúrskinslausn),
- töflusetning ertingar-/ætingarsvörunar fyrir hvert einstakt dýr á hverjum athugunartíma fram að því að dýrið er tekið úr prófuninni,
- lýsing í samfelldu máli á styrk og eðli þeirrar ertingar eða ætingar sem kom fram,
- lýsing á öðrum augnskemmum (t.d. æðun, myndun æðavagls á glæru, samgróningar og litun),
- lýsing á öllum staðbundnum og skaðlegum útbreiddum áhrifum utan augans sjálfs og vefjameinafræðilegar niðurstöður, ef einhverjar eru.

Umfjöllun um niðurstöður.

3.2 TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Niðurstöður úr augnertingarrannsóknum á tilraunadýrum verða aðeins yfirfærðar að takmörkuðu marki á menn. Í mörgum tilvikum eru kanínuhvítingjar næmari en menn fyrir augnertandi eða augnætandi efnun.

Við túlkun gagna skal þess gætt að útiloka ertingu sem stafar af fylgisýkingu.

4. **HEIMILDASKRÁ**

- 1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.
- 2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159–164.
- 3) Worth A.P. og Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.
- 4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.
- 5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.
- 6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. og Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, bls. 483–524.
- 6a) Testing Method B.40 Skin Corrosion (prófunaraðferð B.40, húðæting).
- 7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion (prófunaraðferð B.4. Bráð eiturrhrif: húðerting/húðæting).
- 8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Haldin í Solna, Svíþjóð, 22–24. janúar 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, nóvember 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 10) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment nr. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

I. TAFLA STIGAGJÖF FYRIR AUGNSKEMMDIR**Glæra**

Ógagnsæi: þéttleikastig (þéttasta svæðið er metið) (*)

Engin sáramyndun eða ógagnsæi	0
Dreifð eða óljós svæði þar sem fram kemur ógagnsæi (annað en að eðlilegur gljái dofni lítilega), smáatriði í lithimnu eru mjög greinileg	1
Auðgreinanleg, hálfagnsæ svæði, smáatriði í lithimnu sums staðar örlítið óskýr	2
Perlumóðurlituð svæði, öll smáatriði í lithimnu eru óskýr, erfitt er að meta stærð sjáaldurs	3
Ógagnsæ glæra, lithimnan ógreinanleg	4

Hámarksgildi: 4

(*) Skrá skal stærð svæðisins þar sem glæran er ógagnsæ

Lithimna

Eðlileg	0
Merkjanlega dýpri fellingar, vökvasókn, bólga, blóðsöfnun í kringum glæruna í meðallagi eða mikil blóðfylling smáæða, lithimna sýnir svörun við ljósi (litið er á hæga svörun sem áhrif)	1
Blæðing, stórsæjar skemmdir, engin svörun við ljósi	2

Hámarksgildi: 2

Augnslímhúð (tára)

Roði (hér er átt við slímhúð augnloks og auga en ekki glæru eða lithimnu)

Eðlileg	0
Sumar æðar greinilega blóðríkar (blóðfylltar)	1
Dreifður, djúprauður litur, einstakar æðar ekki auðgreinanlegar	2
Dreifður, dimmrauður litur	3

Hámarksgildi: 3

Augnslímhúðarbjúgur (chemosis)

Bólga (hér er átt við augnlok og/eða blikhimnu)

Eðlileg	0
Dálítill bólga	1
Greinileg bólga, augnlokin verða að hluta úthverf	2
Bólga, augnlokin eru u.þ.b. hálflokuð	3
Bólga, augnlokin eru meira en hálflokuð	4

Hámarksgildi: 4

VIDAUKI

Raðprófunaráætlun fyrir augnertingu og augnætingu

ALMENN ATRIÐI

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra er mikilvægt að nota ekki tilraunadýr að nauðsynjalausu og að draga sem mest úr prófunum sem líklegt er að kalli fram mikla svörun hjá dýrum. Allar upplýsingar um efni sem varða augnertingar- eða augnætingarmátt þess skulu metnar áður en hugað er að prófun í lífi. Hugsanlegt er að þegar liggi fyrir nægilegar upplýsingar til að flokka viðkomandi prófunarefni með tilliti til augnertingar- eða augnætingarmáttar þess án þess að gera þurfi prófanir á tilraunadýrum. Greining á sönnunarvægi niðurstaðna og raðprófunaráætlun dregur því úr þörfinni á prófun í lífi, einkum ef efnið er líklegt til að kalla fram mikla svörun.

Mælt er með því að fram fari greining á sönnunarvægi niðurstaðna til að meta fyrirbyggjandi upplýsingar um augnertingar- og augnætingarmátt efna og til að ákvarða hvort rétt sé að gera frekari rannsóknir, aðrar en augnrannsóknir í lífi, sem hjálpað geta við lýsingu á þeim mætti. Sé þörf á frekari rannsóknnum er mælt með því að notuð sé raðprófunaráætlun til að afla viðeigandi tilraunagagna. Þegar um er að ræða efni sem hafa ekki verið prófuð áður skal nota raðprófunaráætlun við öflun þeirra gagna sem þarf til að meta augnætingar- eða augnætingarmátt efna. Prófunaráætlunin, sem lýst er í þessum viðauka, var samin á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (1. heimild). Hún var síðar staðfest og aukin fyrir hnattsamræmda kerfið til hættuflokkunar á áhrifum iðefna á heilbrigði manna og umhverfið, samþykkt á 28. sameiginlega fundi iðefnanefndar og iðefnavinnuhóps stofnunarinnar í nóvember 1998 (2. heimild).

Þótt þessi prófunaráætlun sé ekki órofa hluti af prófunaraðferð B.5 er hún sú áætlun sem mælt er með til að ákvarða augnertingar- eða augnætingareiginleika. Áætlunin felur bæði í sér bestu starfsvenjur og siðareglur fyrir prófun í lífi á augnertingu eða augnætingu. Í lýsingu á prófunaraðferðinni eru gefnar leiðbeiningar um framkvæmd prófana í lífi og tekin saman þau atriði sem þarf að afgreiða áður en til greina kemur að gera slíka prófun. Í raðprófunaráætluninni er greining á sönnunarvægi niðurstaðna notuð sem aðferð til að meta fyrirbyggjandi gögn um augnertingar- eða augnætingareiginleika prófunarefna og stigskipt aðferð til að afla viðeigandi gagna um efni sem útheimta frekari rannsóknir eða sem engar rannsóknir hafa verið gerðar á. Samkvæmt áætluninni skal fyrst gera fullgiltar og viðurkenndar prófanir í lífi eða utan lífs og síðan rannsaka húðertandi eða húðæandi eiginleika samkvæmt aðferð B.4. við tiltekna aðstæður (3. og 4. heimild).

LÝSING Á ÆPREPSKIPTRI PRÓFUNARÁÆTLUN

Áður en gerðar eru prófanir sem eru hluti af raðprófunaráætlun (mynd) skal meta allar fyrirbyggjandi upplýsingar til að ákvarða þörfina á augnprófun í lífi. Vera kann að afla megi mikilvægra upplýsinga með mati á einstökum færribreytum (t.d. mjög hátt eða mjög lágt sýrustig) en þó ber að meta allar fyrirbyggjandi upplýsingar í heild sinni. Öll viðeigandi gögn um áhrif efnisins, sem um er að ræða, og áhrif efna með hliðstæða byggingu skulu metin þegar tekin er ákvörðun sem byggist á sönnunarvægi niðurstaðna og skal rökstyðja ákvörðunina. Leggja skal megináherslu á fyrirbyggjandi gögn um áhrif efnisins á menn og dýr og því næst á útkomuna úr prófun í glasi og utan lífs. Reynt skal eftir megni að komast hjá rannsóknnum í lífi á ætandi efnum. Eftirfarandi atriði skulu m.a. tekin til greina í prófunaráætluninni:

Mat á fyrirbyggjandi gögnum um áhrif á menn og dýr (1. þrep). Fyrst skal skoða fyrirbyggjandi gögn um áhrif á menn, t.d. úr klínískum rannsóknum og rannsóknnum á starfsumhverfi, og ferilskýrslur og/eða prófunargögn úr augnrannsóknum um áhrif á dýr þar eð þessi gögn veita beinar upplýsingar um áhrif á augu. Því næst skal meta fyrirbyggjandi gögn úr rannsóknum á mönnum og/eða dýrum þar sem húðæting eða húðerting var könnuð. Liggi fyrir vitneskja um að efni hafi ætandi eða mjög ertandi áhrif á augu skal ekki bera það í augu dýra né efni sem sýnt hefur verið fram á að hafi ætandi eða ertandi áhrif á húð enda skal líta svo á að slík efni hafi einnig ætandi og/eða ertandi áhrif á augu. Ekki skal heldur prófa efni í augnrannsóknum í lífi ef fullnægjandi sannanir hafa fengist fyrir því í fyrri augnrannsóknum að efnið séu hvorki ætandi né ertandi.

Greining á venslum efnabyggingar og virkni (2. þrep). Skoða skal niðurstöður úr prófunum á efnum með skylda byggingu, ef þær eru fyrir hendi. Ef fyrir liggja gögn úr prófunum á mönnum og/eða dýrum um efni, sem eru skyld að byggingu, eða blöndur slíkra efna og gögnin nægja til að sýna augnætingar- eða augnertingarmátt þeirra má ganga út frá því að prófunarefnið framkalli sömu svörun. Þegar svo er þarf e.t.v. ekki að prófa efnið. Neikvæð gögn úr rannsóknum á efnum með skylda efnabyggingu eða blöndu slíkra efna eru ekki næg sönnun, samkvæmt raðprófunaráætluninni, fyrir því að tiltekið efni sé ekki ætandi eða ertandi. Nota skal fullgiltar og viðurkenndar aðferðir til að sanngreina ætingar- og ertingarmátt bæði fyrir húð og augu.

Eðlisefnafraeðilegir eiginleikar og hvarfgirni (3. þrep). Efni með óvenjulega hátt eða lágt sýrustig, t.d. $\leq 2,0$ eða $\geq 11,5$, geta haft mikil, staðbundin áhrif. Ef óvenjuhátt eða -lágt sýrustig er notað sem mælikvarði á það hvort efni er augnætandi eða augnertandi er eðlilegt að skoða einnig sýru- eða basaforða eða jafnarýmd efnisins (5. og 6. heimild). Ef jafnarýmdin gefur til kynna að efnið sé ekki augnætandi skal gera frekari prófanir til að staðfesta þetta og er ákjósanlegast að nota fullgilta og viðurkennda prófun í glasi eða utan lífs (sjá 5. og 6. þrep).

Mat á öðrum fyrirbyggjandi upplýsingum (4. þrep) Á þessu stigi skal meta allar fyrirbyggjandi upplýsingar um útbreidd eiturrhif við upptöku gegnum húð. Einnig skal huga að bráðum eiturrhifum prófunarefnisins á húð. Ef sýnt hefur verið fram á að prófunarefnið sé mjög eitrað við upptöku gegnum húð kann að vera óþarfi að prófa það á augum. Þótt ekki sé sjálfgefið að samband ríki milli bráðra eiturrhifa á húð og augnertingar eða augnætningar má gera ráð fyrir því að efni, sem er mjög eitrað við upptöku gegnum húð, sýni líka mikil eiturrhif þegar því er dreypt í auga. Þessi gögn má einnig skoða milli 2. og 3. þreps.

Niðurstöður úr prófunum í glasi eða utan lífs (5. og 6. þrep). Ekki þarf að prófa efni á dýrum ef sýnt hefur verið fram á að þau séu mjög ætandi eða mjög ertandi í prófunum í glasi eða utan lífs (7. og 8. heimild), sem hafa verið fullgiltar og viðurkenndar sérstaklega fyrir mat á ætingu eða ertingu í augum eða húð. Ganga má út frá því að slík efni hafi svipuð áhrif í lífi. Ef engar niðurstöður úr fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi eða utan lífs eru fyrir hendi skal sleppa 5. og 6. þrepi og fara beint upp á 7. þrep.

Mat í lífi á húðertandi eða húðætandi eiginleikum efnisins (7. þrep). Ef gögn úr framangreindum rannsóknnum nægja ekki til ótvíræðrar greiningar á sönnunarvægi niðurstaðna með tilliti til augnertingar- eða augnætningarmáttar efnis skal fyrst meta húðertingar- eða húðætningarmátt þess í lífi með aðferð B.4 (4. heimild) og viðaukanum við lýsingu á aðferðinni (9. heimild). Ef sýnt hefur verið fram á að efnið valdi ætingu eða mikilli húðertingu ber að líta svo á að það sé ætandi eða ertandi fyrir augun nema aðrar upplýsingar gefi tilefni til annarrar niðurstöðu. Þá þarf ekki að gera augnprófun í lífi. Ef efnið er hvorki húðætandi né mjög húðertandi skal gera augnprófun í lífi.

Prófun í lífi á kaninum (8. og 9. þrep). Augnprófun í lífi skal byrja með upphafsprófun á einu dýri. Ef niðurstöður úr þessari prófun sýna að efnið er augnætandi eða mjög augnertandi skal ekki gera frekari prófanir. Leiði prófunin hvorki í ljós ætandi né mjög ertandi áhrif er gerð staðfestingarprófun með tveimur dýrum til viðbótar.

HEIMILDASKRÁ

- 1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Haldin í Solna, Svíþjóð, 22.–24. janúar 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P. og Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161- 177.
- 4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion (prófunaraðferð B.4. Bráð eiturrhif: húðerting/húðætning.)
- 5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.
- 6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.
- 7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. og Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 12, bls. 483–524.
- 8) Testing Method B.40 Skin Corrosion (prófunaraðferð B.40. Húðætning).
- 9) Annex to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion (viðauki við prófunaraðferð B.4: raðprófunaráætlun fyrir húðertingu og húðætningu).

MYND
PRÓFUNAR- OG MATSÁÆTLUN FYRIR AUGNERTINGU/AUGNÆTINGU

	Aðgerðir	Niðurstaða	Ályktun
1	Fyrirliggjandi gögn úr prófunum á mönnum og/eða dýrum sýna áhrif á augu Fyrirliggjandi gögn úr prófunum á mönnum og/eða dýrum sýna áhrif á húð Fyrirliggjandi gögn úr prófunum á mönnum og/eða dýrum sýna alvarleg, ertandi áhrif á húð	Alvarlegur augnskaði Augnertandi Ekki augnætandi/ekki augnertandi Húðætandi Mjög húðertandi	Endapunktur: talið augnætandi. Ekki er þörf á prófun. Endapunktur: talið augnertandi. Ekki er þörf á prófun. Endapunktur: hvorki talið augnætandi né augnertandi. Ekki er krafist prófunar. Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á prófun. Skal teljast augnertandi. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Upplýsingar ekki fyrirliggjandi eða ekki afdráttarlausar		
	↓		
2	Framkvæma skal greiningu á venslum efnabyggingar og virkni með tilliti til augnætingar eða augnertingar Framkvæma skal greiningu á venslum efnabyggingar og virkni með tilliti til húðætingar	Vænta má alvarlegs augnskaða Vænta má augnertingar Vænta má húðætingar	Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á prófun. Skal teljast augnertandi. Ekki er þörf á prófun. Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Ekki er hægt að spá eða spár eru óljósar eða neikvæðar		
	↓		
3	Sýrustig skal mælt (jafnarýmd ef við á)	pH ≤ 2 eða ≥ 11,5 (með mikilli jafnarýmd, ef við á)	Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	2 < pH < 11,5 eða pH ≤ 2,0 eða ≥ 11,5 (með lítilli eða engri jafnarýmd, ef við á)		
	↓		
4	Meta skal útbreidd eiturrhif við upptöku í gegnum húð	Mjög eitrað í þeim styrk sem yrði notaður við prófun efnis í augum.	Efnið er of eitrað fyrir prófun. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Þessar upplýsingar eru ekki fyrirliggjandi eða efnið er ekki mjög eitrað		
	↓		
5	Framkvæma skal fullgilta og viðurkennda augnætingarprófun í glasi eða utan lífs	Ætandi svörun	Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		



2. VIÐAUKI F

„B.31. RANNSÓKN Á EITURHRIFUM Á ÞROSKUN Á FORBURÐARSKEIÐI

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð samsvarar OECD TG 414 (2001).

1.1 INNGANGUR

Þessi aðferð til prófunar á eiturrhifum á þroskun er hönnuð með það fyrir augum að afla almennra upplýsinga um váhrif á tilraunadýr með fangi og á lifveru á þroskunarskeiði í móðurlífi. Undir þetta getur fallið mat á áhrifum á móður, svo og dauði, og frávik í líkamsbyggingu eða vaxtarbreyting fósturs. Þótt starfræn skerðing sé mikilvægur þáttur í þroskun er rannsókn á henni ekki fastur liður í þessari aðferð. Starfræna skerðingu má prófa í sérannsókn eða sem viðbót við þessa rannsókn og þá með prófunaraðferðinni fyrir taugaeiturhrið á þroskun. Til rannsókna á starfrænni skerðingu og öðrum áhrifum á lifveru eftir fæðingu má nota aðferðirnar sem notaðar eru við rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun hjá tveimur kynslóðum og rannsókn á taugaeiturhriðum á þroskun.

Nauðsynlegt kann að reynast að laga þessa prófunaraðferð sérstaklega að einstökum tilvikum á grundvelli sértækrar þekkingar, t.d. á eðlisefnafræðilegum eða eiturefnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins. Slík aðlögun er við hæfi ef fyrir liggja sannfærandi, vísindaleg gögn þess efnis að aðlögunin leiði til þess að betri upplýsingar fái úr prófuninni. Þegar svo er skal gera ítarlega grein fyrir þessum vísindalegu gögnum í rannsóknarskýrslunni.

1.2 SKILGREININGAR

Eiturefnafræði þroskunar: rannsókn á skaðlegum áhrifum á lifveru á þroskunarskeiði sem kunna að stafa af váhrifum fyrir getnað, á fósturþroskunarskeiði eða eftir fæðingu og fram að kynþroska. Helstu birtingarform eiturrhifa á þroskun eru 1) dauði lifverunnar, 2) óeðlilegt frávik í líkamsbyggingu, 3) vaxtarbreyting og 4) starfræn skerðing. Áður var eiturefnafræði þroskunar oft kölluð vanskapanafraðei.

Skaðleg áhrif: meðferðartengt frávik frá grunnviðmiðun sem minnkar hæfni lifveru til að lifa af, fjölga sér eða laga sig að umhverfinu. Eiturefnafræði þroskunar í viðasta skilningi nær yfir öll áhrif sem raska eðlilegri þroskun fangs (conceptus), jafnt fyrir sem eftir burð.

Vaxtarbreyting: breyting á líffæri afkvæmis eða líkamsþyngd eða -stærð afkvæmis.

Breytingar (frábrigði): breytingar í þroskun sem taka bæði til vansköpunar og afbrigða (28. heimild)

Vansköpun/stórvægilegt frávik: Breyting í líkamsbyggingu sem telst skaðleg fyrir dýrið (getur verið banvæn) og er yfirleitt sjaldgæf.

Afbrigði/smávægilegt frávik: Breyting í líkamsbyggingu sem telst hafa lítil sem engin skaðleg áhrif á dýrið og getur verið tímabundin og tiltölulega algeng í samanburðarþýðinu.

Fang (conceptus): frjóvgað egg og allt sem því tilheyrir á hvaða þroskunarstigi sem er, frá frjóvgun til fæðingar, þ.m.t. fósturhimnur sem og fósturvísirinn eða fóstrið.

Hreiðrun (bólfeita): festing kímblöðru við þekjuvef legs, þ.m.t. gegnþrenging hennar í legþekju og greyping hennar í legslímhúð.

Fósturvísir: fyrsta þroskunarstig lifveru, nánar tiltekið það stig sem þroskast úr frjóvguðu eggi eftir að langásinn myndast og þar til öll helstu líffæri hafa myndast.

Eiturhrif á fósturvísu: skaðleg áhrif á eðlilega gerð, þroskun, vöxt og/eða lífvænleika fósturvísu.

Fóstur: óborið afkvæmi eftir fósturvísisskeiði.

Eiturhrif á fóstur áhrif sem skaða eðlilega líkamsbyggingu, þroskun, vöxt og/eða lífvænleika fósturs.

Fósturlát: ótímabær missir fangs, þ.e. fósturvísu eða ólífvænlegs fósturs, úr legi.

Uppleysing (resorption) fang sem hefur dáið eftir hreiðrun í legi og er að leysast upp eða hefur þegar leyst upp.

Snemmkomin uppleysing: merki um hreiðrun án greinanlegs fósturvísu eða fósturs.

Síðbúin uppleysing andvana fósturvísu eða fóstur með merki um útvortis hröfnunarbreytingar

NOAEL: skammtstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“, þ.e. stærsti skammturinn eða mesti váhrifastyrkurinn sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum.

1.3 VIDMIÐUNAREFNI

Ekkert.

1.4 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Efnið er yfirleitt gefið dýrum með fangi, a.m.k. á tímanum frá hreiðrun fram að deginum fyrir áætlaðan aflifunardag sem skal vera eins nálægt eðlilegum gotdegi og unnt er án þess að hætta sé á því að gögn fari forgörðum vegna gots fyrir tímann. Tilgangurinn með prófunaraðferðinni er ekki að rannsaka einungis tímann þegar líffærin myndast (t.d. 5. – 15. dag hjá nagdýrum og 6. – 18. dag hjá kaninum) heldur einnig áhrifin frá því fyrir hreiðrun, eftir því sem við á, og allan meðgöngutímann fram að deginum fyrir keisaraskurð. Stuttu fyrir keisaraskurð eru kvendýrin aflifuð, leginnihaldið rannsakað og fósturin metin með tilliti til sýnilegra frábrigða og breytinga í mjúkvæf og beinagrind.

1.5 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1 Val á dýrategund

Mælt er með því að prófunin sé gerð á þeirri dýrategund sem hentar best og að notaðar séu tegundir og stofnar tilraunadýra sem algengast er að nota í prófunum á eiturhrifum á þroskun á forburðarskeiði. Rottur eru ákjósanlegustu nagdýrin en ef nagdýr eru ekki notuð eru kanínur ákjósanlegasta tegundin. Ef notuð er önnur dýrategund skal það rökstutt.

1.5.2 Aðbúnaður og fæðun

Hiti í vistarverum tilraunadýra skal vera 22 (±3) °C þegar um nagdýr er að ræða og 18 (±3) °C þegar um kanínur er að ræða. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki meiri en 70%, nema við þríf á vistarverunum, er kjöraki 50 – 60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fæður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

Þörun skal fara fram í búrum sem henta í þeim tilgangi. Æskilegt er að hvert parað dýr sé í sérstöku búi en einnig er heimilt að hafa litla hópa saman í búi.

1.5.3 Undirbúningur dýra

Nota skal heilbrigð dýr sem hafa verið látin laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. 5 daga og hafa ekki verið notuð áður í tilraunir. Veita skal upplýsingar um tegund, stofn, uppruna, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýra. Dýrin í öllum prófunarhópnum skulu, eftir því sem framast er kostur, vera sem líkust að þyngd og aldri. Á öllum skammtastigum skal nota fullorðin, eibær (nulliparous) kvendýr.

Kvendýrin skulu pöruð við karldýr af sömu tegund og stofni en forðast skal að para systkini saman. Þegar um er að ræða nagdýr telst dagurinn þegar vart verður við leggangatappa og/eða sæði vera dagur 0 á meðgöngu. Þegar um kanínur er að ræða er dagur 0 á meðgöngu yfirleitt dagur mökunar eða sæðingar, ef sú tækni er notuð. Pöruðum kvendýrum skal skipt af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Hvert dýr fær sitt eigið kenninúmer. Pöruðum kvendýrum skal skipt af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópana og ef kvendýrin eru pöruð í lotum skal skipta dýrunum úr hverri lotu jafnt á hópana. Einnig skal skipta kvendýrum, sem sama karldýrið hefur gagnast, jafnt á hópana.

1.6 FRAMKVÆMD

1.6.1 Fjöldi og kyn dýra

Í hverjum prófunar- og samanburðarhópi skulu vera svo mörg kvendýr að u.þ.b. 20 kvendýr, sem fest hafa fang, verði til krufningar. Ef færri en 16 dýr í hópi hafa fest fang kann það að þykja ófullnægjandi. Ekki er sjálfgefið að dánarhlutfall kvendýra með fangi ógildi rannsóknina svo fremi það fari ekki yfir u.þ.b. 10%.

1.6.2 Tilreiðsla skammta

Ef burðarefni eða önnur íblöndunarefni eru notuð til að auðvelda skömmtnun skal taka tillit til eftirfarandi eiginleika: áhrif á frásog, dreifingu, efnaskipti og geymd (retention) eða útskilnað prófunarefnisins, áhrif á efnafræðilega eiginleika prófunarefnisins sem kunna að breyta eitureiginleikum þess og áhrif á fôðurát og vatnsdrykkju eða á næringarástand dýranna. Burðarefnið skal hvorki valda eiturrhifum á þroskun né hafa áhrif á æxlun.

1.6.3 Skammtar

Að jafnaði skal gefa prófunarefnið daglega frá hreiðrun (t.d. á 5. degi frá pörun) og fram að deginum fyrir áætlaðan keisaraskurð. Ef forrannsóknir liggja fyrir og benda ekki til mikils fangloss fyrir hreiðrun má lengja meðferðina þannig að hún nái yfir allan meðgöngutímann frá mökun og fram að deginum fyrir áætlaðan aflifunardag. Það er alkunna að röng meðhöndlun eða streita á meðgöngutíma getur komið af stað ótímabæru fanglosi. Reyna skal að komast hjá bæði óþarfri meðhöndlun dýra með fangi sem og streitu af utanaðkomandi orsökum, svo sem hávaða, til að koma í veg fyrir ótímabært fanglos af völdum þátta sem tengjast ekki meðferðinni.

Nota skal að minnsta kosti þrjár skammtastærðir og samskeiða samanburðarhóp. Heilbrigðum kvendýrum skal skipt af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópana. Skammtastærðum skal hagað þannig að eiturrhifin verði stigvaxandi. Við val á stærsta skammtinum skal það haft að leiðarljósi, ef eðlisefnafræðilegir eða líffræðilegir eiginleikar prófunarefnisins hamlar því ekki, að kalla fram einhver eiturrhif á þroskun og/eða á móður (klínísk einkenni eða minnkun líkamsþyngdar) en ekki dauða eða miklar þjáningar. Heppilegast er að a.m.k. einn milliskammtur framkalli minnstu merkjanleg eiturrhif. Minnsti skammtur ætti ekki að framkalla nein merki um eiturrhif á móður eða á þroskun. Velja skal röð skammta, sem fara stigminnkandi, til að sýna fram á hugsanleg vensl svörunar og mismunandi skammtastærða og þann hámarksskammt sem hefur engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2 – 4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil milli skammtastærða (til dæmis stærri en stuðulinn tíu). Þótt markmiðið sé að ákveða mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif má einnig samþykka rannsóknir þar sem slík mörk eru ekki ákvörðuð (1. heimild)

Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum fyrirbyggjandi gögnum um eiturrhif auk upplýsinga um efnaskipti og eiturefnaferla prófunarefnisins eða skyldra efna. Þessar upplýsingar koma einnig að gagni við að sýna fram á að skömmtnunin sé fullnægjandi.

Nota skal samskeiða samanburðarhóp. Þessi hópur skal fá sýndarmeðferð eða meðferð með burðarefni eingöngu ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins. Allir hópunir skulu fá sama rúmmál annaðhvort af prófunarefni eða burðarefni. Dýr í samanburðarhópnum eða -hópnum skulu meðhöndluð á nákvæmlega sama hátt og dýrin í prófunarhópnum. Í samanburðarhópum, sem fá burðarefni, skal gefa mesta magn burðarefnis sem er notað (eins og í prófunarhópnum sem fær minnsta skammtinn).

1.6.4 Markprófun

Ítarleg rannsókn með þremur skammtastærðum kann að teljast ónauðsynleg ef engin merkjanleg eiturrhif koma fram hjá kvendýrum með fangi eða afkvæmum þeirra í prófun með inngjöf um munn og einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, þar sem fylgt er verklagsreglum samkvæmt þessari rannsóknarlýsingu og ef áhrifa er ekki að vænta

samkvæmt fyrirbyggjandi gögnum (t.d. frá efnum sem eru skyld að byggingu og/eða efnaskiptum). Þau váhrif, sem vænst er að menn verði fyrir, benda hugsanlega til þess að nota þurfi stærri skammta við gjöf um munn í markprófuninni. Þegar íkomuleið er önnur, t.d. með innöndun eða um húð, gefa eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnisins oft til kynna og takmarka hámarksskammtinn sem er notaður (t.d. ætti áburður á húð ekki að valda miklum, staðbundnum eiturhrifum).

1.6.5 Gjöf skammta

Prófunarefnið eða burðarefnið er venjulega gefið um munn með slöngu. Sé notuð önnur íkomuleið skal prófandinn rökstyðja það og tilgreina ástæðurnar fyrir vali sínu enda kann það að útheimta viðeigandi breytingar (2., 3. og 4. heimild). Prófunarefnið skal gefið á því sem næst sama tíma dag hvern.

Skammturinn, sem hvert dýr fær, skal að jafnaði miðast við síðustu ákvörðun á líkamsþyngd. Þó skal sýna varkárni þegar skammturinn er leiðréttur á síðasta þriðjungi meðgöngu. Nota skal fyrirbyggjandi gögn við val á skammtastærð til að koma í veg fyrir kröftug eiturhrif á móður. Ef vart verður kröftugra eiturhrifa hjá kvendýrum með fangi í meðferðinni skal aflífa þau á mannúðlegan hátt. Ef mörg kvendýr með fangi sýna merki um kröftug eiturhrif kemur til greina að hætta við hópinn sem fær þann skammt. Ef efnið er gefið með slöngu er best að það sé gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inngjafarslöngu. Stærð prófunardýrsins ræður því hve mikinn vökva má gefa inn í einu. Rúmmálið ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef maisolía er notuð sem burðarefni má rúmmálið ekki vera meira en 0,4 ml/100 g líkamsþyngdar. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkinn þannig að rúmmál haldist jafnt, hver sem skammturinn er.

1.6.6 Athugun á kvendýrum með fangi

Gera skal og skrá klínískar athuganir a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma á hverjum degi, með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfnni. Skrá skal ástand dýranna, þ.m.t. dánarhlutfall, hlutfall dauðvona dýra, viðeigandi breytingar á hegðun og öll augljós merki eiturhrifa.

1.6.7 Líkamsþyngd og fóðurát

Vigta skal dýrin á degi 0 á meðgöngu (eða eigi síðar en á 3. degi meðgöngu ef um er að ræða dýr frá utanaðkomandi ræktanda sem eru þöruð á tilteknum tíma), á fyrsta degi skammtagjafar og a.m.k. þriðja hvern dag á skammtatímabilinu og á áætluðum aflifunardegi.

Fóðurneyslu skal skrá með þriggja daga millibili á sömu dögum og dýrin eru vigtuð.

1.6.8 Skoðun eftir aflifun

Kvendýr skulu aflífuð daginn áður en þess er vænst að þau gjóti. Kvendýr, sem sýna merki um fösturlát eða ótímabært got fyrir áætlaðan aflifunardag skulu aflífuð og skoðuð í nákvæmri, stórsæri rannsókn.

Þegar meðferð kvendýrs með fangi lýkur eða dýrið drepst skal það skoðað með berum augum til að kanna hvort vart verði við frávik í líkamsbyggingu eða sjúklegar breytingar. Mat á kvendýrum við keisaraskurð og fösturgreining, sem gerð er í kjölfarið, skal helst gerð án vitneskju um í hvaða meðferðarhópi þau eru, til að halda bjögun í lágmarki.

1.6.9 Rannsókn á innihaldi legs

Um leið og meðferð dýra er lokið eða sem fyrst eftir dauða þeirra skal fjarlægja legið og ganga úr skugga um hvort dýrin séu með fangi eða ekki. Skoða skal betur leg úr dýrum sem virðast ekki með fangi (t.d. með ammoníumsúlfíðblettun, ef um nagdýr er að ræða, og Salewski-blettun eða annarri hentugri aðferð ef um kanínur er að ræða) til að staðfesta fangleysi dýranna (5. heimild).

Vigta skal leg úr dýrum með fangi, að leghálsinum meðtöldum. Ekki skal vigta leg úr dýrum með fangi hafi dýrin drepist í rannsókninni.

Ákvarða skal fjölda gulbúa hjá kvendýrum með fangi.

Skoða skal innihald legs til að kanna fjölda dauðra fósturvísa eða fóstura og fjölda lífvænlegra fóstura. Lýsa skal því hversu langt uppleysing er komin svo að unnt sé að meta líklega dauðastund fangsins (sjá lið 1.2).

1.6.10 Rannsókn á fósturum

Ákvarða skal kyn og líkamsþyngd hvers fósturs.

Rannsaka skal hvert fóstur með tilliti til ytri breytinga (6. heimild).

Fóstur skulu rannsökuð með tilliti til breytinga á beinagrind og mjúkvef (t.d. afbrigði og vansköpun eða frábrigði) (7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 23. og 24. heimild). Helst skal flokka fósturbreytingar þótt þess sé ekki krafist. Að lokinni flokkun skal gera skýra grein fyrir viðmiðunum við skilgreiningu hvers flokks. Gefa skal sérstakan gaum að æxlunarfærum og skoða hvort þar sjáist merki um frávik frá eðlilegri þroskun.

Þegar um nagdýr er að ræða skal undirbúa og rannsaka u.þ.b. helming af hverju goti með tilliti til breytinga á beinagrind. Afganginn skal undirbúa og rannsaka með tilliti til breytinga á mjúkvef og nota til þess viðurkenndar eða viðeigandi raðsneiðingaraðferðir eða vandaðar aðferðir til stórsærrar krufningar.

Þegar um er að ræða önnur dýr en rottur, t.d. kanínur, skal rannsaka öll fóstur með tilliti til bæði mjúkvefjar og breytinga á beinagrind. Meta skal líkama þessara fóstura með vandvirknislegri krufningu til að kanna breytingar á mjúkvef en undir þetta falla aðferðir til frekara mats á innri byggingu hjartans (25. heimild). Fjarlægja skal hausana á helmingi fósturanna, sem eru rannsökuð á þennan hátt, og undirbúa þau fyrir mat á breytingum í mjúkvef (þ.m.t. augu, heili, nefgöng og tunga) með stöðluðum raðsneiðingaraðferðum (26. heimild) eða annarri jafnnæmri aðferð. Undirbúa skal og rannsaka líkama þessara fóstura og ósnertu fósturinn, sem eftir eru, með tilliti til breytinga á beinagrind og nota til þess sömu aðferð og lýst var fyrir nagdýr.

2. GÖGN

2.1 ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Skrá skal gögn fyrir hvert dýr með fangi og fyrir afkvæmi þeirra og setja þau í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp og hverja kynslóð, fjöldi dýra í upphafi prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tíminn þegar þau drápust eða voru aflífuð, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýnir merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum um eiturhrif sem vart varð, þ.m.t. hvenær þeirra varð vart, hversu lengi þau vöruðu og hve mikil eiturhrifin voru og hvers konar athuganir voru gerðar á fósturvísu/fósturum, auk allra gagna um afkvæmin í gotinu sem máli skipta.

Meta skal tölulegar niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð og nota gotið sem einingu fyrir gagnagreiningu. Nota skal almennt viðurkennda tölfræðiaðferð en val á tölfræðiaðferðum skal vera liður í hönnun rannsóknarinnar og valið skal rökstutt. Einnig skal skýra frá gögnum um dýr sem lifa ekki fram að áætluðum aflífunardegi. Þessi gögn má taka inn í hópmeðaltalið ef við á. Rökstyðja skal og meta, í hverju tilviki fyrir sig, hvert sé vægi gagnanna um þessi dýr og hvort þau skuli höfð með í hópmeðaltölum eða sleppt.

2.2 MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal niðurstöður úr rannsóknum á eiturhrifum á þroskun á forburðarskeiði út frá þeim áhrifum sem vart varð. Matið skal taka til eftirfarandi upplýsinga:

— prófunarniðurstöður fyrir móður og fósturvísi eða fóstur, þ.m.t. hvort samband ríkir milli váhrifa prófunarefnisins á dýrin annars vegar og tíðni og alvarleika allra niðurstæðna hins vegar,

- viðmiðanir sem eru notaðar til að flokka ytri mjúkvæf fösturs og breytingar á beinagrind, hafi flokkun farið fram,
- rannsóknarsöguleg samanburðargögn, ef við á, til að styrkja túlkun rannsóknarniðurstæðna,
- tölurnar sem eru notaðar til að reikna út öll hundradshlutföll eða stuðla,
- fullnægjandi tölfraðigreining á rannsóknarniðurstöðum, ef við á, með svo miklum upplýsingum um greiningaraðferðina að óháður rýnir/tölfraðingur geti endurmetið og endurgert greininguna.

Í öllum rannsóknum, þar sem sýnt er fram á að eiturrhif eru engin, kemur til greina að gera frekari kannanir til að staðfesta frásög og aðgengi prófunarefnisins.

2.3 TÚLKUN NIÐURSTÆÐNA

Við rannsókn á eiturrhifum á þroskun á forburðarskeiði fást upplýsingar um áhrif endurtekinna váhrifa frá tilteknu efni á kvendýr með fangi og á þroskun afkvæma þeirra í leginu. Niðurstöður rannsóknarinnar ber að túlka í samhengi við niðurstöður úr rannsóknum á hálflangvinnum eiturrhifum, skaðlegum áhrifum á æxlun, rannsóknum á eiturefnaferlum og öðrum rannsóknum. Þar eð áhersla er bæði lögð á endapunkta fyrir almenn eiturrhif á móður og eiturrhif á þroskun gera niðurstöðurnar úr rannsókninni kleift að greina að ákveðnu marki á milli þeirra áhrifa á þroskun, sem koma fram þótt ekki sé um almenn eiturrhif að ræða, og áhrifa sem koma aðeins fram þegar skammtarnir eru einnig eitradir fyrir móðurina (27. heimild).

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtalдар sérupplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- gögn til sanngreiningar, þ.m.t. CAS-númer ef það er þekkt eða til,
- hreinleiki.

Burðarefni (ef við á):

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

- tegund og stofn dýra,
- fjöldi og aldur dýranna,
- uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

- rök fyrir vali á skammtastærð,
- lýsing á samsetningu prófunarefnisins/blöndun í fóður, styrk efnisins og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,
- upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

- umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fódri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag) þegar við á,
- umhverfisskilyrði,
- upplýsingar um gæði fódurs og vatns.

Niðurstöður:

Gögn um eiturhrifasvörun hjá móður í hverjum skammtaflokki, þ.m.t. en ekki einvörðungu:

- gögn um fjölda dýra í upphafi prófunar, fjölda dýra sem lifðu af, fjölda kvendýra með fangi, fjölda fósturláta og fjölda kvendýra sem gutu fyrir tímann,
- dauðadagur meðan á rannsókninni stóð eða hvort dýrin lifa tilraunina af,
- gera skal grein fyrir gögnum um dýr sem lifa ekki fram að áætlaðri aflifun en ekki skal taka þau gögn með í tölfræðilegum samanburði milli hópanna,
- tilgreining þess dags þegar vart verður við óeðlilegar, klínískar breytingar og hver framvinda þeirra varð,
- líkamsþyngd, breyting á líkamsþyngd og þyngd legs úr dýrum með fangi, þ.m.t. (valfrjálst) breyting á líkamsþyngd með leiðréttingu fyrir þyngd legs úr dýrum með fangi,
- fódurát og vatnsdrykkja, ef hún er mæld,
- niðurstöður krufninga, þ.m.t. þyngd legs,
- greina skal frá gildum fyrir mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL).

Endapunktur þroskunar, miðað við skammtastærðir, fyrir hvert got þar sem hreiðrun hefur átt sér stað, þ.m.t.:

- fjöldi gulbúa,
- fjöldi hreiðrana, fjöldi og hundraðshlutfall lifandi og dauðra fóstura og tilvika þar sem uppleysing hefur átt sér stað,
- fjöldi og hundraðshlutfall fangláta fyrir og eftir hreiðrun.

Endapunktur þroskunar, miðað við skammtastærðir, fyrir hvert got með lifandi fósturum, þ.m.t.:

- fjöldi og hundraðshlutfall lifandi afkvæma,
- kynjahlutfall,
- líkamsþyngd fóstura, helst fyrir hvort kyn og bæði kyn saman,
- vansköpun (ytri, í mjúkvef og beinagrind) og aðrar breytingar sem skipta máli,
- viðmiðanir við flokkun, ef við á,
- heildarfjöldi og hundraðshlutfall fóstura og fyrir hvert got án breytinga (ytri, í mjúkvef eða beinagrind), svo og tegundir og tíðni einstaklingsbundinna frábrigða og annarra breytinga sem skipta máli.

Umræða um niðurstöður.

Ályktanir.

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.
- 2) Kimmel, C.A. og Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.
- 3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.
- 4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- 5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- 6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ritstjóri) 3. bindi. Academic Press, NY.
- 7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue og Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.
- 8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381–391.
- 9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229–242.
- 10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- 11) Barrow, M.V. og Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291–306.
- 12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.
- 13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398–408.
- 14) Kimmel, C.A. og Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.
- 15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.
- 16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, bls. 163–173.
- 17) Spark, C. og Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.
- 18) Staples, R.E. og Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.
- 19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.
- 20) Stuckhardt, J.L. og Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.
- 21) Walker, D.G. og Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

-
- 22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. og Warkany J. (ritstj.). University of Chicago, Chicago, IL, bls. 251–277.
 - 23) Wilson, J.G. og Fraser, F.C. (ritstj.). (1977) *Handbook of Teratology*, 4. bindi. Plenum, NY.
 - 24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233–239.
 - 25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.
 - 26) Van Julsingha, E.B. og C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. og Kwasigroch, T.E. (ritstj.). University of Chicago, Chicago, IL, bls. 126–144.
 - 27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.
 - 28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249–292.“
-

2. VÍÐAUKI G

„B.35. RANNSÓKN Á SKAÐLEGUM ÁHRIFUM Á ÆXLUN HJÁ TVEIMUR KYNSLÓÐUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð samsvarar OECD TG 416 (2001).

1.1 INNGANGUR

Þessi aðferð við æxlunarprófun á tveimur kynslóðum er hönnuð með það fyrir augum að afla almennra upplýsinga um áhrif prófunarefnis á heilleika og starfsemi æxlunarkerfa karl- og kvendýra, þ.m.t. kynkirtlastarfsemi, gangferil, mökunarhegðun, getnað, meðgöngu, got, mjólkurmyndun og fráfærur (þegar vanið er af spena) og á vöxt og þroskun afkvæma. Rannsóknin getur einnig gefið upplýsingar um áhrif prófunarefnisins á sjúkdómstíðni og dánarhlutfall nýbura og bráðabirgðagögn um eiturrhif á þroskun fyrir og eftir got og auk þess verið leiðbeinandi í prófunum sem fylgja í kjölfarið. Ætlunin með þessari prófunaraðferð er að meta heilleika og starfsemi æxlunarkerfa karl- og kvendýra og einnig vöxt og þroskun F2-kynslóðarinnar, auk þess að rannsaka vöxt og þroskun F1-kynslóðarinnar. Hægt er að fá frekari upplýsingar um eiturrhif á þroskun og starfræna skerðingu með því að bæta rannsóknaráföngum inn í þessa aðferðarlýsingu og hafa þar til hliðsjónar aðferðir til að meta eiturrhif á þroskun og/eða taugaeiturrhif á þroskun, eftir því sem við á, eða með því að rannsaka þessa endapunkta í sérstökum rannsóknum og nota til þess viðeigandi prófunaraðferðir.

1.2 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunarefnið í kvörðuðum skömmtum. Karlkýrin af foreldrakynslóð (P) fá skammta meðan þau eru að vaxa og í a.m.k. einn heilan sæðismyndunarhring (u.þ.b. 56 dagar hjá músum og 70 dagar hjá rottum) til að kalla fram skaðleg áhrif prófunarefnisins á sæðismyndun, ef um þau er að ræða. Áhrif á sæði eru ákvörðuð með ýmsum færibreytum er varða sæði (t.d. útlit og hreyfanleiki sæðisfrumna) og með skoðun vefjasýna og ítarlegum vefjameinafræðilegum athugunum. Ef til eru gögn um sæðismyndun úr eldri og nógu langvarandi rannsókn með endurteknum skömmtum, t.d. úr 90 daga rannsókn, er ekki nauðsynlegt að hafa karldýr úr P-kynslóðinni með í matinu. Þó er mælt með því að sýni af sæðisfrumum P-kynslóðarinnar eða stafræn upptaka með þeim verði geymd svo að unnt verði að meta þau síðar. Kvendýr af foreldrakynslóðinni (P) fá skammta meðan þau eru að vaxa og í nokkra heila gangferla (oestrus cycles) til að kalla fram skaðleg áhrif prófunarefnisins á eðlileg gangmál, ef um þau er að ræða. Prófunarefnið er gefið dýrum af foreldrakynslóðinni (P) meðan á mökun og meðgöngu stendur og allan tímann meðan afkvæmi þeirra (F1-kynslóðin) er vanin af spena. Að afstöðnum fráfærum hjá afkvæmum í F1-kynslóðinni er þeim gefið efnið allt vaxtarskeiðið og þörunartímabilið og þar til fráfærur afkvæma þeirra (F2-kynslóðin) eru afstaðnar.

Gerðar eru klínískar athuganir og meinafræðilegar rannsóknir á öllum dýrum til að finna merki um eiturrhif og er sérstaklega gefinn gaumur að áhrifum á heilleika og starfsemi æxlunarfæra karl- og kvendýra og á vöxt og þroskun afkvæma.

1.3 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.3.1 Val á dýrategund

Rottan er ákjósanlegasta tegundin fyrir þessa prófun. Séu notaðar aðrar tegundir þarf að rökstyðja það og gera viðeigandi breytingar. Ekki skal nota stofna ef frjósemi þeirra er lítil eða vitað er að þroskunargallar eru algengir. Í upphafi tilraunarinnar skulu frávik í þyngd dýranna vera í lágmarki og ekki víkja meira en 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

1.3.2 Aðbúnaður og fæðun

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (±3) °C. Þótt hlutfallslegur raki eigi að vera minnst 30% og helst ekki meiri en 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjöraki 50–60%.

Nota skal gervilyngu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á föðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunarefni í föðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð.

Dýrin má hafa hvert í sínu búri eða litla hópa af sama kyni saman í búri. Þörun skal fara fram í búrum sem eru til þess ætluð. Þegar vísbendingar eru um að mökun hafi átt sér stað skulu þöruðu kvendýrin höfð hvert í sínu gotbúri eða búri fyrir kvendýr með unga. Paraðar rottur má einnig hafa í litlum hópum og skilja þær í sundur einum eða tveimur dögum fyrir got. Þegar stytist í got skulu þöruðu dýrin hafa aðgang að viðeigandi og nánar skilgreindum efniviði til að gera sér bæli.

1.3.3 Dýrin undirbúin

Nota skal heilbrigð, ung dýr sem hafa verið látin laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. 5 daga og hafa ekki verið notuð áður í tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, uppruna, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýranna. Nauðsynlegt er að þekkja skyldleikatengsl meðal dýranna til að komast megi hjá því að para systkini saman. Dýrunum skal skipt af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa (mælt er með lagskiptingu eftir líkamsþyngd). Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Hvert dýr fær sitt eigið og sérstaka kenninúmer. Dýr af P-kynslóðinni skulu fá númerið áður en skammtagjöf hefst. Dýr skulu fá kenninúmer við fráfærur þegar um er að ræða dýr af F1-kynslóðinni sem eru valin til þörunar. Halda skal skrár yfir öll F1-dýr, sem hafa verið valin, þar sem fram kemur úr hvaða goti þau eru. Að auki er mælt með því að hver ungi sé merktur sem fyrst eftir fæðingu ef til greina kemur að vigta hvern unga fyrir sig eða gera starfrænar prófanir.

Dýr af foreldrakynslóðinni (P) skulu vera u.þ.b. 5 – 9 vikna gömul við upphaf skammtagjafar. Dýrin í öllum prófunarhópunum skulu vera svo svipuð sem unnt er að þyngd og aldri.

1.4 FRAMKVÆMD

1.4.1 Fjöldi og kyn dýra

Í hverjum prófunar- og samanburðarhópi skulu vera svo mörg dýr að u.þ.b. 20 kvendýr með fangi séu í hverjum hópi á gottíma eða rétt fyrir gottíma. Þegar um er að ræða efni, sem valda óæskilegum, meðferðartengdum áhrifum (t.d. ófrjósemi og kröftugum eiturrhrifum eftir stóra skammta), er ekki víst að þetta sé gerlegt. Markmiðið er að nógu mörg kvendýr festi fang til að unnt sé að vinna marktækt mat á mætti efnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu og atferli mæðra og á tímabil mjólkurgjafar og vöxt og þroskun F1-afkvæma frá getnaði þar til þau eru fullþroska sem og þroskun afkvæma þeirra (F2) fram að fráfærum. Þetta þýðir að þótt ekki takist að fá nógu mörg kvendýr til að festa fang (þ.e. 20 kvendýr) er rannsóknin ekki endilega orðin ógild heldur er hægt að meta hvert tilvik fyrir sig.

1.4.2 Tilreiðsla skammta

Mælt er með því að prófunarefnið sé gefið um munn (með föðri, drykkjarvatni eða magaslöngu) nema önnur íkomuleið (t.d. um húð eða með innöndun) sé talin heppilegri.

Ef nauðsyn krefur er prófunarefnið leyst upp eða haft sem sviflausn í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/sviflausnir í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/ýrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktilir. Ákvarða ber stöðugleika prófunarefnisins í burðarefninu.

1.4.3 Skömmtun

Nota skal að minnsta kosti þrjár skammtastærðir og samskeiða samanburðarhóp. Við val á stærsta skammtinum skal það haft að leiðarljósi, ef eðlisefnafræðilegir eða líffræðilegir eiginleikar prófunarefnisins hamla því ekki, að kalla fram eiturrhrif en hvorki dauða né miklar þjáningar. Verði óvænt dauðsföll teljast rannsóknir gildar ef dánartíðnin er um það bil 10 prósent eða þar undir hjá foreldrakynslóðinni (P). Velja skal röð skammta sem fara stigminnkandi til að sýna fram á hugsanleg vensl svörunar og skammtastærða og ákvarða mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL). Oft

er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2 – 4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum tíu). Við föðurrannsóknir skal bil á milli skammtastærða ekki vera meira en þrefalt. Velja skal skammtastærð með hliðsjón af fyrirliggjandi gögnum um eiturhrif, einkum niðurstöðum úr rannsóknnum með endurteknum skammti. Einnig skal vega og meta allar fyrirliggjandi upplýsingar um efnaskipti og hvarfafræði prófunarefnisins eða skyldra efna. Auk þess koma þessar upplýsingar einnig að gagni við að sýna fram á að skömmtunin sé fullnægjandi.

Samanburðarhópurinn skal ekki hafa fengið meðferð eða hann skal eingöngu fá burðarefni ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins. Dýrin í samanburðarhópnum fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunarefnið. Ef burðarefni er notað skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammt sem er notaður af burðarefninu. Ef prófunarefni er gefið með föðrinu og það veldur því að dregur úr föðuráti eða notkun getur verið nauðsynlegt að föðra samanburðarhópinn samhliða. Að öðrum kosti má nota gögn úr stýrðum rannsóknnum sem eru gerðar til að meta áhrif minnkandi föðuráts á æxlunarferibreytur í stað samskeiða samanburðarhóps sem er föðraður samhliða.

Hafa skal í huga eftirfarandi eiginleika burðarefnisins og annarra aukefna: áhrif á frásog, dreifingu, efnaskipti eða geymd prófunarefnisins, áhrif á efnafræðilega eiginleika prófunarefnisins sem kunna að breyta eitureiginleikum þess og áhrif á föðurát og vatnsdrykkju dýranna eða á næringarástand þeirra.

1.4.4 Markprófun

Ef rannsókn á gjöf um munn með einni skammtastærð sem er a.m.k. 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, eða samsvarandi hundraðshluti með föðri eða drykkjarvatni, og notað er það verklag, sem lýst er fyrir þessa rannsókn, leiðir ekki í ljós nein merkjanleg eiturhrif, hvorki í foreldrakynslóðinni né hjá afkvæmum hennar og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu og/eða efnaskiptum er ekki talin ástæða til fullrar rannsóknar með mörgum mismunandi skammtastærðum. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn bendir til þess að gefa þurfi stærri skammt um munn. Þegar íkomuleið er önnur, t.d. með innöndun eða um húð, geta eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnisins, t.d. leysni, oft verið takmarkandi fyrir þann hámarksskammt sem nota má.

1.4.5 Gjöf skammta

Prófunarefnið skal gefið dýrunum sjö daga í hverri viku. Mælt er með gjöf um munn (með föðri, drykkjarvatni eða með magaslöngu). Séu notaðar aðrar íkomuleiðir þarf að rökstyðja það og gera viðeigandi breytingar. Öll dýrin skulu fá skammtana með sömu aðferð á viðkomandi tímabili tilraunarinnar. Þegar prófunarefni er gefið með slöngu er rétt að nota magaslöngu til þess. Rúmmál vökva sem er gefinn í einu ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar (0,4 ml/100 g líkamsþyngdar er hámarkið þegar um er að ræða máisólíu) nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun meiri áhrif sem styrkurinn er meiri, skal halda rúmmáli efnisins sem jöfnustu með því að stilla styrk þess þannig að rúmmálið haldist stöðugt hver sem skammtastærðin er. Í rannsóknnum með magaslöngu skal að jafnaði aðeins gefa ungum prófunarefni óbeint með mjólkinni eða þar til farið er að gefa þeim skammta beint við fráfærur. Í rannsóknnum, þar sem prófunarefnið er gefið með föðri eða drykkjarvatni, fá ungarnir efnið að auki beint þegar þeir byrja að éta föður sjálfir síðustu viku mjólkurskeiðsins.

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með föðri eða drykkjarvatni er áriðandi að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- eða vökvajafnvægi. Ef prófunarefni er gefið inn með föðri á annaðhvort að nota fastan styrk (í milljónarhlutum) í föðrinu eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna; taka skal fram hvor kosturinn er valinn. Ef efnið er gefið með magaslöngu skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann a.m.k. vikulega þannig að skammtastærð sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Vega skal og meta upplýsingar um dreifingu í fylgju þegar ákvarða skal skammt sem gefinn er um magaslöngu og miðast við þyngd.

1.4.6 Tilraunaáætlun

Karl- og kvendýr af foreldrakynslóðinni (P) skulu fyrst fá daglega skammta þegar þau eru 5 til 9 vikna gömul. Dagleg skömmtun karldýra og kvendýra af F1-kynslóðinni skal hefjast við fráfærur; hafa skal í huga að þegar prófunarefni er gefið með föðri eða drykkjarvatni geta F1-ungarnir orðið fyrir beinum váhrifum af prófunarefninu strax á mjólkurskeiðinu. Skömmtun skal haldið áfram fyrir bæði kynin (P og F1) í a.m.k. 10 vikur áður en þörunartímabil hefst. Skömmtun er haldið áfram hjá báðum kynjum á tveggja vikna þörunartímabilinu. Karldýrin skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og skoðuð þegar þeirra er ekki lengur þörf vegna mats á áhrifum á æxlun. Kvendýr af foreldrakynslóð (P) skulu áfram fá skammt alla meðgönguna og allt fram að fráfærum afkvæma þeirra af F1-kynslóðinni.

Vega skal og meta hvort breyta skuli tímasetningu skömmunar út frá tiltækum upplýsingum um prófunarefnið, þ.m.t. fyrirleggjandi gögn um eiturrhif, örvun efnaskipta eða uppsöfnun í lífverum. Skammturinn, sem hvert dýr fær, skal að jafnaði miðast við nýjustu mælingu á líkamsþyngd. Þó skal sýna varkarni þegar skammturinn er leiðréttur á síðasta þriðjungi meðgöngu.

Halda skal áfram meðferð karldýra og kvendýra af foreldrakynslóð (P) og F1-kynslóð þar til rannsókn lýkur. Öll fullorðin karldýr og kvendýr af P- og F1-kynslóð skulu aflifuð á mannúðlegan hátt þegar þeirra er ekki lengur þörf vegna mats á áhrifum á æxlun. Afkvæmi F1-kynslóðarinnar, sem eru ekki valin til þörunar, og öll afkvæmi F2-kynslóðarinnar skulu aflifuð á mannúðlegan hátt eftir fráfærur.

1.4.7 **Pörunaraðferð**

1.4.7.1 *Pörun foreldrakynslóðar (P)*

Við hverja þörun skal hvert kvendýr haft með einu karldýri sem fær sömu skammtastærð (1:1 þörun) þar til mökun á sér stað eða 2 vikur eru liðnar. Á hverjum degi skal athuga hvort á kvendýrunum sjáist sæði eða leggangatappi. Dagurinn þegar leggangatappi eða sæði finnst telst vera dagur 0 á meðgöngu. Ef þörun mistekst má reyna að para kvendýrið saman við karldýr sem hefur reynst frjótt. Þörunardýr skulu greinilega auðkennd í gögnunum. Sneiða skal hjá því að para saman systkin.

1.4.7.2 *Pörun F1-kynslóðar*

Þegar afkvæmi af F1-kynslóð eru þöruð skal við fráfærur velja a.m.k. eitt karldýr og eitt kvendýr úr hverju goti til þörunar við aðra unga, sem fá sömu skammtastærð en eru úr öðru goti, til að fá fram F2-kynslóðina. Velja skal unga úr hverju goti af handahófi þegar enginn marktækur munur er á líkamsþyngd eða útliti unga úr sama goti. Komi fram slíkur munur skal velja þau dýr sem eru helst dæmigerð fyrir hvert got. Heppilegast virðist að gera þetta á grundvelli líkamsþyngdar en það getur átt betur við að velja dýrin eftir útliti. Ekki skal para afkvæmi F1-kynslóðarinnar fyrr en þau hafa náð fullum kynþroska.

Þör án afkvæma skulu rannsökuð til að ákvarða líklega ástæðu fyrir ófrjóseminni. Þetta má t.d. gera með því að reyna að para dýrin með öðrum karl- eða kvendýrum sem hafa reynst frjósöm, með smásjárathugun á æxlunarfærum dýranna og með því að kanna gangferilinn eða sáðfrumumyndunina.

1.4.7.3 *Önnur þörun*

Í tilteknum tilvikum, s.s. við meðferðartengdar breytingar á stærð gots eða athuganir á óvissuáhrifum í fyrstu þörun, er mælt með því að dýr af P-kynslóð eða fullvaxin dýr af F1-kynslóð séu þöruð aftur til að framkalla annað got. Mælt er með því að para aftur afkvæmalaus kvendýr eða karldýr með dýrum af hinu kyninu sem hafa reynst frjósöm. Ef nauðsynlegt er talið að fá fram annað got hjá annarri hvorri kynslóðinni skulu dýr þöruð aftur u.þ.b. einni viku eftir fráfærur unga úr síðasta goti.

1.4.7.4 *Stærð gots*

Dýrin skulu fá að gjóta á eðlilegan hátt og ala afkvæmi sín fram að fráfærur. Valfrjálst er að staðla gotstærðina. Við stöðlun skal lýsa ítarlega aðferðinni sem er notuð.

1.5 **ATHUGANIR**

1.5.1 **Klínískar athuganir**

Gera skal almennar klínískar athuganir á hverjum degi og sé um að ræða skammtagjöf með magaslöngu skal tímasetning ákveðin með hliðsjón af þeim tíma sem áætlað er að hámarksáhrif af skammtagjöfinni komi fram. Skrá skal breytingar á atferli, merki um erfiða eða langvarandi fæðingu og öll merki um eiturrhif. Fara skal fram nákvæmari viðbótarathugun á hverju dýri a.m.k. einu sinni í viku og mætti til hagræðis gera það um leið og dýrið er vegið. Öll dýr skulu skoðuð tvisvar á dag (einu sinni á dag um helgar ef við á) með tilliti til veikinda- og dánartilvika.

1.5.2 Líkamsþyngd og fôðurát og vatnsdrykkja undaneldisdýra (parent animals)

Dýr sem eru notuð til undaneldis (P og F1) skulu vegin á fyrsta degi skömmtnar og a.m.k. vikulega eftir það. Undaneldiskvendýr (P og F1) skulu vegin a.m.k. á dögum 0, 7, 14 og 20 eða 21 á meðgöngunni og á mjólkurskeiðinu á sömu dögum og ungarnir eru vegnir, svo og þann dag sem dýrin eru aflífuð. Halda skal sérstaka skrá yfir þessar athuganir fyrir hvert dýr. Mæla skal fôðurát a.m.k. vikulega á tímabilinu áður en pörun á sér stað og á meðgöngunni. Vatnsdrykkju skal mæla a.m.k. vikulega ef prófunarefnið er sett út í vatnið.

1.5.3 Gangferill

Meta skal lengd gangferils og hvort hann er eðlilegur hjá kvendýrum af P- og F1-kynslóð með stroki úr leggöngum fyrir pörun, og helst meðan á pörun stendur, þar til staðfesting fæst á því að mökun hafi átt sér stað. Þegar frumur eru teknar úr leggöngum eða leghálsi skal gæta varúðar svo að ekki verði röskun á slímhúð sem gæti leitt til sýndarþungunar síðar (1. heimild).

1.5.4 Sæðisfæribreytur

Við lok tilraunarinnar skal skrá þyngd á eistum og eistalyppum allra karldýra af P- og F1-kynslóð og geyma skal eitt af hvoru líffæri fyrir vefjameinafræðilegar rannsóknir (sjá liði 1.5.7 og 1.5.8.1). Eistu og eistalyppur, sem fást úr undirhópi sem í eru a.m.k. tíu karldýr úr hverjum hópi af P- og F1-kynslóð, skulu notuð fyrir talningu á einsleitnisþolnum (homogenisation-resistant) forsæðisfrumum (spermatids) annars vegar og sæðisfrumuförða í eistalyppurófu (cauda epididymal sperm reserve) hins vegar. Úr þessum sama undirhópi karldýra er hægt að safna sæðisfrumum úr eistalyppurófu eða sáðrás til að meta hreyfanleika og formfræði sæðisfrumna. Ef í ljós koma meðferðartengd áhrif, eða ef visbendingar liggja fyrir úr öðrum rannsóknum um hugsanleg áhrif á sáðfrumumyndun skal leggja mat á sæðisfrumur allra karldýra í hverjum skammtahópi; að öðrum kosti skal talningin takmarkast við karldýr af P- og F1-kynslóð í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn.

Finna skal heildarfjölda einsleitniþolinnar forsæðisfrumna í eistum og sæðisfrumum í eistalyppurófu (2. og 3. heimild). Finna má forða sæðisfrumna í eistalyppurófu út frá styrk og rúmmáli sæðis í sviflausn sem er notuð til að ljúka eigindlegu mati og fjölda sæðisfrumna, sem endurheimtust eftir mölun og/eða þegar það sem eftir er af vefnum úr eistalyppurófunni er gert einsleitt. Talningin skal gerð á undirhópi karldýra úr öllum völdum skammtahópum strax eftir að dýrin eru aflífuð nema myndbandsupptökur eða stafrænar upptökur séu gerðar eða sýnin séu fryst og greind síðar. Í þeim tilvikum má greina fyrst samanburðarhópin og hópinn sem fær stærsta skammtinn. Ef engin meðferðartengd áhrif (t.d. áhrif á fjölda sæðisfrumna, hreyfanleika eða formfræði) koma í ljós þarf ekki að greina sýni úr hinum skammtahópnum. Ef vart verður við meðferðartengd áhrif í hópnum sem fær stærsta skammtinn skal einnig meta hópana sem fá minni skammt.

Meta skal eða festa á myndband hreyfanleika sæðisfrumna úr eistalyppum (eða sáðrás) strax eftir aflífun. Sæðisfrumur skulu endurheimtar og þess gætt að þær skaðist sem minnst og þynning fyrir greiningu á hreyfanleika skal gerð með viðunandi aðferðum (4. heimild). Hundraðshluti sæðisfrumna, sem fá smám saman aukinn hreyfanleika, skal ákvarðaður annaðhvort á huglægan eða hlutlægan hátt. Ef tölva er notuð við greiningu á hreyfanleika (5., 6., 7., 8., 9. og 10. heimild) er vaxandi hreyfanleiki, sem eykst smám saman, fundinn á grundvelli markgilda sem notandi skilgreinir fyrir meðalhraða eftir braut eða línulegan stuðul. Ef myndbandsupptaka er gerð af sýnum (11. heimild) eða myndirnar eru teknar upp á annan hátt við krufningu er hægt að einskorða síðari greiningu við karldýr af P- og F1 kynslóð í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammt nema meðferðartengd áhrif komi í ljós. Í því tilviki skal einnig meta hópa sem fá minni skammt. Séu engar myndbandsupptökur eða stafrænar myndir til skulu öll sýni í öllum meðferðarhópum greind við krufningu.

Mat á formfræði sæðisfrumna úr eistalyppum (eða sáðrás) skal fara fram. Frumurnar (a.m.k. 200 í hverju sýni) skulu rannsakaðar í festu, fullbúnu votsýni (12. heimild) og flokkaðar annaðhvort sem eðlilegar eða óeðlilegar. Dæmi um formfræðilega galla sæðisfrumna eru t.d. samruni, stök höfuð og afmynduð höfuð og/eða halar. Meta skal undirhóp karldýra úr öllum völdum skammtahópum annaðhvort strax eftir að dýrin eru aflífuð eða síðar eftir því hvort myndbandsupptökur eða stafrænar upptökur hafa verið gerðar.

Stroksýni, sem búið er að festa, má einnig rannsaka síðar. Í þeim tilvikum má greina fyrst samanhæðarhópinn og hópinn sem fær stærsta skammtinn. Ef engin meðferðartengd áhrif (t.d. áhrif á formfræði sæðisfrumna) koma í ljós þarf ekki að greina sýni úr hinum skammtahópnum. Ef vart verður við meðferðartengd áhrif í hópnum sem fær stærsta skammtinn skal einnig meta hópana sem fá minni skammt.

Ef einhverjar af fyrrgreindum færðbreytum fyrir mat á sæðisfrumum hafa þegar verið rannsakaðar sem hluti af rannsókn á útbreiddum eiturskrifum, sem stendur a.m.k. í 90 daga, er ekki nauðsynlegt að endurtaka þær í tveggja kynslóða rannsókn. Þó er mælt með því að sýni af sæðisfrumum P-kynslóðarinnar eða stafræn upptaka með þeim verði geymd til að unnt verði að meta þau síðar ef nauðsyn krefur.

1.5.5 Afkvæmi

Rannsaka skal hvern gothóp eins fljótt og hægt er að loknu goti (mjólkurskeiðsdagur 0) til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæddra, fjölda lifandi unga og stórsæ frábrigði. Æskilegt er að rannsaka unga, sem finnast dauðir á degi 0, ef þeir eru nægilega heillegir, með tilliti til hugsanlegra galla og þess hver dánarorsökin er og varðveita þá. Lifandi ungar skulu taldir og vegnir, hver um sig, við fæðingu (mjólkurskeiðsdagur 0), eða á fyrsta degi, og reglulega eftir það á vissum vigtunardögum, t.d. á 4., 7., 14. og 21. degi mjólkurskeiðs. Líkamleg eða atferlisleg afbrigði, sem koma í ljós hjá undaneldismæðrum eða afkvæmum, skulu skráð.

Líkamleg þroskun afkvæmanna skal fyrst og fremst skráð sem aukning á líkamsþyngd. Aðrar líkamlegar færðbreytur (t.d. eyrna- og augnaop, tannkoma og hárvöxtur) geta gefið frekari upplýsingar en þessi gögn skulu helst metin í tengslum við gögn um kynþroska (t.d. aldur og líkamsþyngd við opnun legganga eða aðskilnað limhúfu (glans penis) og forhúðar (balano-preputial separation) (13. heimild). Mælt er með starfrænum rannsóknum (s.s. á hreyfistarfsemi, starfsemi skynfæra, taugaviðbrögðum) hjá afkvæmum af F1-kynslóð fyrir og/eða eftir fráfærur, einkum þeim rannsóknum sem tengjast kynþroska, ef slíkar rannsóknir eru ekki hluti af sjálfstæðum rannsóknum. Ákvarða þarf aldur við opnun legganga og aðskilnað limhúfu og forhúðar hjá ungum af F1-kynslóð sem hafa verið vandir af spena og valdir til þörunar. Mæla skal bil milli endaparmsops og limrótar (anogenital distance) á degi 0 eftir fæðingu í ungum af F2-kynslóð ef það telst nauðsynlegt vegna breytinga á kynjahlutfalli í F1-kynslóð eða vegna tímasetningar kynþroska.

Sleppa má starfrænum athugunum í hópum þar sem á annan hátt má sjá greinileg merki um skaðleg áhrif (t.d. þegar verulega dregur úr þyngdaraukningu o.s.frv.). Ef starfrænar rannsóknir eru gerðar skal ekki gera þær á ungum sem valdir eru til þörunar.

1.5.6 Stórsæ krufning

Við lok meðferðar eða dauða í rannsókninni skulu öll undaneldisdýr (P og F1), allir ungar með frávík í ytri gerð eða klínísk einkenni, svo og einn ungi af hvoru kyni og fyrir hvert got valinn af handahófi úr bæði F1- og F2-kynslóðinni, sett í stórsæja rannsókn með tilliti til hvers konar frávika í líkamsbyggingu eða meinafræðilegra breytinga. Gefa skal líffærum æxlunarkerfisins sérstakan gaum: Rannsaka skal unga, sem eru aflífaðir mannúðlega þegar þeir eru dauðvona, og dauða unga, ef þeir eru nægilega heillegir, með tilliti til hugsanlegra galla og/eða þess hver dánarorsökin er og varðveita þá.

Rannsaka skal leg allra kvendýra sem eru þöruð í fyrsta sinn, á þann hátt að það spilli ekki vefjameinafræðilegu mati, með tilliti til þess hvort hreiðrun hafi átt sér stað og þá hve mörg tilvikin eru.

1.5.7 Þyngd líffæra

Við lok meðferðar skal ákvarða líkamsþyngd og þyngd eftirfarandi líffæra í öllum undaneldisdýrum bæði af P- og F1-kynslóð (þöruð líffæri skulu vegin hvort í sínu lagi):

- leg, eggjastokkar,
- eistu, eistalypur (í heild og rófan (cauda)),
- blöðruhálskirtill,

— sáðblöðrur með hlaupkirtlum og tilheyrandi vökva og blöðruhálskirtill (sem ein heild),

— heili, lifur, nýru, milta, heiladingull, skjaldkirtill og nýrnahettur og þekkt markliffæri.

Líkamsþyngd í lok tilraunar skal ákvörðuð fyrir unga af F1- og F2-kynslóð sem eru valdir til krufningar. Eftirfarandi líffæri úr einum unga völdum af handahófi af hvoru kyni og fyrir hvert got (sjá lið 1.5.6) skulu vegin: heili, milta og hóstarkirtill.

Niðurstöður úr stórsæri krufningu og vigtun líffæra skulu metnar í tengslum við athuganir sem gerðar eru í öðrum rannsóknum með endurteknum skömmtum, ef þurfa þykir.

1.5.8 Vefjameinafræði

1.5.8.1 Undaneldisdýr

Eftirfarandi líffæri og vefir úr undaneldisdýrum (af P- og F1-kynslóð) eða dæmigerð sýni úr þeim skulu fest og geymd í viðeigandi miðli fyrir vefjameinafræðilega rannsókn:

— leggöng, leg ásamt leghálsi og eggjastokkum (varðveitt í hæfilegu festiefni),

— eitt eista (varðveitt í Bouins-festiefni eða samsvarandi festiefni), ein eistalyppa, sáðblöðrur, blöðruhálskirtill og hlaupkirtill,

— áður tilgreind markliffæri úr öllum dýrum af P- og F1-kynslóð sem valin eru til þörunar.

Framkvæma skal fulla vefjameinafræðirannsókn á varðveittum líffærum og vefjum sem tilgreind eru hér að framan fyrir öll dýr sem fá mesta skammt og samanburðarhópa af P- og F1-kynslóð sem valin eru til þörunar. Rannsókn á eggjastokkum af dýrum af P-kynslóð er valfrjál. Einnig skal rannsaka líffæri sem sýna merki um meðferðartengdar breytingar í hópum sem fá litla eða meðalstóra skammta til að fá skýrari vitneskju um mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif. Auk þess skal fara fram vefjameinafræðilegt mat á æxlunarfærum dýra sem fá lítinn og meðalstóran skammt, ef grunur leikur á um skerta frjósemi hjá þeim, t.d. þeirra sem parast ekki, fá ekki fang, frjóvga ekki eða fæða ekki heilbrigð afkvæmi eða þar sem áhrifa gætir á gangferil eða fjölda, hreyfanleika eða formfræði sæðisfrumna. Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir, s.s. rýrnun eða æxli.

Fara skal fram nákvæm vefjameinafræðileg rannsókn á eistum (t.d. með því að nota Bouins-festiefni, paraffínölgn og þversneiðar sem eru 4 – 5 µm að þykkt) til að greina meðferðartengd áhrif, s.s. það að forsæðisfrumur skila sér ekki, kímfrumulög eða -gerðir vantar, fjölkjörnóttar risafrumur sjást eða sæðismyndunarfrumur losna inn í hol sáðpiplanna (14. heimild). Rannsókn á óskemmdum eistalyppum skal ná yfir höfuð, bol og rófu þeirra (caput, corpus og cauda), og hana má framkvæma með mati á langsníði af þeim. Meta skal eistalyppur með tilliti til hvítkornaíferðar, breytinga á algengi frumugerða, afbrigðilegra frumugerða og agnáts á sæðisfrumum. Nota má PAS-litun og litun með hematoxýlíni til að rannsaka æxlunarfæri karldýra.

Að loknu mjólkurskeiði skulu eggjastokkarnir innihalda frumeggþú og eggþú í vexti, svo og stór gulþú frá mjólkurskeiði. Í vefjameinafræðilegri rannsókn skal greina eigindlega skerðingu í stofni frumeggþúa. Megindlegt mat á frumeggþúum skal fara fram á kvendýrum í F1-kynslóð; fjöldi dýra, val á sneiðingu eggjastokks og stærð sneiddra sýna skal í tölfræðilegu tilliti hæfa matsaðferðinni sem er notuð. Rannsóknin skal fela í sér að finna út fjölda frumeggþúa, sem má sameina litlum eggþúum í vexti, fyrir samanburð á eggjastokkum dýra sem fá meðferð og dýra í samanburðarhópum (15., 16., 17., 18. og 19. heimild).

1.5.8.2 Ungar eftir fráfærur

Stórsæilega afbrigðilegir vefir og markliffæri úr öllum ungum með frávikum í ytri gerð eða klínísk einkenni skulu fest og varðveitt í viðeigandi miðli fyrir vefjameinafræðilega rannsókn, svo og úr einum unga af hvoru kyni og úr hverju goti sem er valinn af handahófi úr dýrum af bæði F1- og F2-kynslóð sem hafa ekki verið valin til þörunar. Setja skal fram fulla vefjameinafræðilega lýsingu á varðveittum vef með sérstakri áherslu á líffæri í æxlunarkerfinu.

2. GÖGN

2.1 ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Skrá skal gögn fyrir hvert dýr og setja þau í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp og hverja kynslóð, fjöldi dýra í upphafi prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tímann þegar þau drápust eða voru aflífuð, fjöldi frjórra dýra, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum um eiturhrif sem vart varð, þ.m.t. hvenær þeirra varð vart, hversu lengi þau stóðu og hve mikil eiturhrifin voru, hvers konar athuganir voru gerðar á foreldrum og afkvæmum og hvers konar vefjameinafræðilegar breytingar urðu, auk allra gagna um gotið sem máli skipta.

Nota skal viðeigandi, almennt viðurkennda tölfræðiaðferð við mat á tölulegum niðurstöðum en val á tölfræðiaðferðum skal vera liður í hönnun rannsóknarinnar og skal valið stutt rökum. Tölfræðilíkön um tengsl svörunar og skammtastærðar geta verið gagnleg við greiningu gagna. Í skýrslunni skulu koma fram fullnægjandi upplýsingar um greiningaraðferðina og tölvuforritið sem notað var svo að óháður rýnir/tölfræðingur geti endurmetið og endurunnið greininguna.

2.2 MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal niðurstöður úr þessari rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlum hjá tveimur kynslóðum með tilliti til fram kominna áhrifa, þ.m.t. niðurstöður úr krufningu og smásjárrannsóknum. Mat á gögnum skal ná til tengsla, eða tengslaleysis, milli skammts af prófunarefninu og þess hvort um er að ræða frávík eða ekki, hve oft frávík koma fram og hve alvarleg þau eru, þ.m.t. stórsæjar vefjaskemmdir, tiltekin marklíffæri, áhrif á frjósemi, klínísk frávík, áhrif á æxlun og got, breytingar á líkamsþyngd, áhrif á dánartíðni og öll önnur eiturhrif. Taka skal tillit til eðlisefnafræðilegra eiginleika prófunarefnis og gagna, liggi þau fyrir, um eiturefnaferli við mat á prófunarniðurstöðum.

Vel útfærð rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun ætti að gefa viðunandi mat á því þegar engin áhrif verða og skilning á skaðlegum áhrifum á æxlun, got, mjólkurskeið og þroskun eftir fæðingu, þ.m.t. varðandi vöxt og kynþroska.

2.3 TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun hjá tveimur kynslóðum veitir upplýsingar um áhrif endurtekinna váhrifa efnis á öllum stigum æxlunarferlisins. Einkum veitir rannsóknin upplýsingar um æxlunarfæribreytur og um þroskun, vöxt, kynþroska og lifun afkvæma. Niðurstöður rannsóknarinnar skulu túlkaðar í samhengi við niðurstöður úr rannsóknum á hálflangvinnnum eiturhrifum, rannsóknum á eiturhrifum á þroskun fyrir fæðingu og rannsóknum á eiturefnaferlum og öðrum fyrirbyggjandi rannsóknum. Niðurstöður úr þessari rannsókn má nota til að meta þörf á frekari prófunum á tilteknu iðefni. Hægt er að heimfæra niðurstöður rannsóknarinnar yfir á menn að vissu marki. Þær nýttast best til að veita upplýsingar um skammtastærðir sem hafa engin skaðleg áhrif og um leyfileg váhrif hjá mönnum (20., 21., 22. og 23. heimild).

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- gögn til sanngreiningar,
- hreinleiki.

Burðarefni (ef við á):

- rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

- tegund/stofn dýra,
- fjöldi, aldur og kyn dýranna,
- uppruni, aðbúnaður, fóður, efni í bæli o.s.frv.,
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

- rök fyrir vali á skammtastærð,
- nákvæm lýsing á samsetningu prófunarefnisins eða tilreiðslu fôðursins, styrkleikar sem nást,
- stöðugleiki og einsleitni blöndunnar,
- upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,
- umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fôðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,
- upplýsingar um gæði fôðurs og vatns.

Niðurstöður:

- fôðurát og, ef um það er vitað, vatnsdrykkja, nýting fôðurs (aukning líkamsþyngdar á hvert gramm fôðurs sem er étið) og hversu mikið dýr af P- og F1-kynslóð setja í sig af prófunarefninu, að frátöldum þeim tíma sem dýrin lifa saman og a.m.k. síðasta þriðjung mjólkurskeiðsins,
- gögn um frásög, liggi þau fyrir,
- gögn um líkamsþyngd dýra af P- og F1-kynslóð sem eru valin til þörunar,
- gögn um þyngd gots og einstakra unga,
- líkamsþyngd við aflifun og gögn um raunþyngd og hlutfallslega þyngd líffæra úr undaneldisdýrum,
- eðli þeirra atriða sem koma fram við klíniska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau ganga til baka eða ekki),
- dauðastund meðan á rannsókn stendur eða hvort dýrin lifa tilraunina af,
- eiturhrifasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. stuðlar fyrir þörun, frjósemi, meðgöngu, fæðingu, lífvænleika og mjólkurskeið; í skýrslunni skal tilgreina þær tölulegu upplýsingar sem hafa verið notaðar til þess að reikna þessa stuðla,
- eiturhrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi, vöxt eftir fæðingu o.s.frv.,
- niðurstöður krufningar,
- nákvæm lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum;
- fjöldi kvendýra af P- og F1-kynslóð með eðlileg gangmál og gangferil af eðlilegri lengd,
- heildarfjöldi sæðisfrumna í eistalyppurófu, hundraðshluti sæðisfrumna sem fá smám saman aukinn hreyfanleika, hundraðshluti eðlilegra sæðisfrumna að því er varðar formfræði og hundraðshluti sæðisfrumna með hverju tilgreindu frávikanna,
- tími fram að mökun, gefinn upp í fjölda daga,
- lengd meðgöngutíma,

- fjöldi tilvika þar sem hreiðrun hefur orðið og fjöldi gulbúa og stærð gots,
- fjöldi lifandi fæddra unga og fanglát eftir hreiðrun,
- fjöldi unga með stórsæjum frávikum og fjöldi ófullburða afkvæma, ef um slíkt er að ræða,
- gögn um líkamleg einkenni unga og önnur gögn um þroskun eftir fæðingu. Rökstyðja skal valið á þeim líkamlegu einkennum sem mat er lagt á,
- gögn um starfrænar athuganir á ungum og fullorðnum dýrum, eftir því sem við á,
- tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umræða um niðurstöður.

Niðurstöður sem fela í sér gildi fyrir engin merkjanleg, skaðleg áhrif á móður og afkvæmi.

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals*: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston og R.V. Short (ritstj.), Cambridge, New York.
- 2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92–108.
- 3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103–107.
- 4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39–44.
- 5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237–244.
- 6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267–273.
- 7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409–421.
- 8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449–458.
- 9) Slott, V.L. og Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.
- 10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401–415.
- 11) Working, P.K. og M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330–337.
- 12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491–505.
- 13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298–303.
- 14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

- 15) Heindel, J.J. og R.E. Chapin, (ritstj.) (1993). B-hluti. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.
 - 16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ritstj.), Plenum, New York, bls. 421–426.
 - 17) Manson, J.M. og Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ritstj.), Raven, New York.
 - 18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379–383.
 - 19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, og C.A. Kimmel, (ritstj.), ILSI Press, Washington, DC.
 - 20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull og C.D. Klaassen (ritstj.), Pergamon, New York.
 - 21) Zenick, H. og E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ritstj.), Raven Press, New York.
 - 22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. og J. Buelke-Sam (ritstj.), Raven Press, New York.
 - 23) Palmer, A.K. (1978). In: *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson og F.C. Fraser (ritstj.), Plenum Press, New York.“
-

2. VÍÐAUKI H

„B.42. HÚÐNÆMING: EITLAGREINING (LOCAL LYMPH NODE ASSAY)

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD TG 429 (2002)

1.1 INNGANGUR

Eitlagreining (Local Lymph Node Assay (LLNA)) hefur hlotið fullgildingu og viðurkenningu sem nægir til þess að hún er tekin upp sem ný aðferð (1., 2. og 3. heimild). Þetta er önnur aðferðin til að meta húðnæmingarmátt íðefna hjá dýrum. Í fyrri aðferðinni (B.6) eru notaðar prófanir á naggrísum, einkum hámröskunarpöfun á naggrísum og Buehlers-pöfun (4. heimild).

Eitlagreiningin er staðgönguaðferð sem nota má til að sanngreina húðnæmandi íðefni og til að staðfesta að efni búi ekki yfir umtalsverðum mætti til að orsaka húðnæmingu. Þetta þýðir ekki endilega að alltaf skuli nota eitlagreininguna í stað prófunar á naggrísum heldur að greiningin sé jafngild og að hana megi nota sem staðgönguaðferð í tilvikum þar sem jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður þurfa að jafnaði ekki frekari staðfestingar við.

Eitlagreiningin hefur vissa kosti bæði að því er varðar vísindalegar framfarir og velferð dýranna. Hún er notuð til að rannsaka örvunarfasa húðnæmingar og veitir meginlegar upplýsingar sem henta til að meta tengsl svörunar og skammtastærðar. Nánari upplýsingar um fullgildingu eitlagreiningar og yfirlit yfir það starf sem tengist henni hafa verið birtar (5., 6., 7. og 8. heimild). Auk þess skal tekið fram að vægir/hóflægir næmar, sem teljast vera heppilegir sem jákvætt samanburðarefni við prófanir á naggrísum, henta einnig vel þegar eitlagreining er notuð (6., 8. og 9. heimild).

Eitlagreining er aðferð gerð í lífi og þar af leiðandi útilokar hún ekki að dýr séu notuð við mat á næmingu við snertingu. Hún gefur þó færi á því að draga úr fjölda dýra sem nota þarf í þessum tilgangi. Auk þess býður eitlagreiningin upp á verulega framför í meðferð dýra við prófanir á næmingu við snertingu. Eitlagreiningin byggist á athugunum á ónæmisfræðilegum fyrirbærum sem eru örvuð með íðefnum í örvunarfasa næmingar. Ólíkt því sem á við um prófanir á naggrísum er ekki þörf á því við eitlagreiningu að kalla fram áreitissörvaða húðofnæmissvörun. Ekki þarf heldur að nota ónæmisglæði við eitlagreiningu eins og gera þarf við hámröskunarpöfun á naggrísum. Eitlagreining minnkar því þau óþægindi sem dýrin þurfa að þola. Þrátt fyrir kosti eitlagreiningar fram yfir hefðbundnar prófanir á naggrísum hefur hún þó vissar takmarkanir sem geta gert það nauðsynlegt að nota hefðbundnar prófanir á naggrísum (t.d., falsneikvæðar niðurstöður úr eitlagreiningu með tilteknum málum, falsjákvæðar niðurstöður með tilteknum húðertingarefnum)(10. heimild).

Sjá einnig inngang, B-hluta.

1.2 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Eitlagreiningin byggist á þeirri grundvallarreglu að næmar valda fjölgun eitilfrumna í dreinitlinum (draining lymph node) við staðinn þar sem íðefnin voru borin á. Þessi fjölgun er í réttu hlutfalli við skammtinn sem er notaður (og mátt ofnæmisvaldsins) og er einföld leið til að fá hlutlæga og meginlega mælingu á næmingunni. Með eitlagreiningunni er kleift að meta þessa fjölgun sem tengsl svörunar og skammtastærðar þar sem fjölgunin í prófunarhópnum er borin saman við fjölgunina í samanburðarhópnum sem fá burðarefni. Síðan er hlutfallið á milli fjölgunarinnar í meðferðarhópnum og samanburðarhópnum, svokallaður örvunarstuðull (stimulation index), ákvarðaður og stuðullinn verður að vera a.m.k. þrír til þess að prófunarefnið verði skoðað nánar sem hugsanlegur húðnæmir. Aðferðirnar, sem hér er lýst, byggjast á því að notuð sé merking með geislavirku efni til að mæla fjölgun frumna. Þó er hægt að nota aðra endapunkta fyrir mat á fjölgun að því tilskildu að rökstuðningur sé fyrir því og nægilegur vísindagrunnur, þ.m.t. fullnægjandi vísanir í heimildir og lýsing á aðferðinni.

1.3 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.3.1 Undirbúningur

1.3.1.1 *Aðbúnaður og fóðrun*

Dýrin skulu vera hvert í sínu búi. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (± 3) °C. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50 – 60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

1.3.1.2 *Dýrin undirbúin*

Dýrin eru valin af handahófi, merkt þannig að hvert og eitt þeirra þekkist (þó ekki með eyrnamerkingu af neinu tagi) og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en gjöf skammta hefst til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni. Áður en meðferð hefst eru öll dýrin rannsökuð til að tryggja að þau hafi engar sýnilegar húðskemmdir.

1.3.2 Prófunarskilyrði

1.3.2.1 *Tilraunadýr*

Mýs eru notaðar í þessari prófun. Prófunardýrin skulu vera ungar, fullorðnar kvenmýs af stofni CBA/Ca eða CBA/J sem eru eibærar (nulliparous) og ekki með fangi. Í upphafi tilraunarinnar skulu dýrin vera á bilinu 8 – 12 vikna og ekki vikna meira en 20% frá meðalþyngd. Nota má aðra stofna og karldýr þegar nægilegum gögnum hefur verið safnað sem staðfesta að ekki sé um að ræða verulegan mun á svörum eftir stofni og/eða kynjum í eitlagreiningu.

1.3.2.2 *Áreiðanleikakönnun*

Jákvæðum samanburði er beitt til að sýna fram á að greiningin skili tilætluðum árangri og staðfesta hæfi rannsóknarstofunnar til að framkvæma greininguna á árangursríkan hátt. Jákvæði samanburðurinn á að veita jákvæða svörun við eitlagreiningu á því stigi skammtagjafar sem búist er við að kalli fram aukningu í örvunarstuðlinum (SI) >3 umfram neikvæða samanburðarhópinn. Velja skal skammt fyrir jákvæða samanburðinn þannig að örvun sé greinileg en ekki óhóflega mikil. Efni, sem mælt er með, eru hexýlsinnamínaldehyd (CAS-nr. 101-86-0, EINECS-nr. 202-983-3) og merkaptóbensópíasól (CAS-nr. 149-30-4, EINECS-nr. 205-736-8). Við vissar aðstæður má nota önnur samanburðarefni sem uppfylla áðurgreind skilyrði, enda séu færð gild rök fyrir því. Þótt að jafnaði sé nauðsynlegt að hafa jákvæðan samanburðarhóp í hverri greiningu geta komið upp aðstæður þar sem rannsóknarstofurnar hafa tiltæk rannsóknarsöguleg gögn sem sýna samkvæmni í fullnægjandi svörum sem spannar sex mánaða tímabil eða lengri tíma. Við þessar aðstæður getur hentað að láta prófanir með jákvæðum samanburði fara fram með lengra millibili en þó ekki sjaldnar en á 6 mánaða fresti. Þótt prófa eigi jákvæða samanburðarefnið í burðarefni sem vitað er að kallar stöðugt fram sömu svörum (t.d. asetón, ólífuolía) geta komið upp tiltekna aðstæður sem tengjast reglusetningu þar sem prófanir í óstöðluðu burðarefni (klínísk/efnafræðileg samsetning) eru einnig nauðsynlegar. Við slíkar aðstæður er rétt að prófun fari fram á vixl með jákvæðu samanburðarefni og þessu óhefðbundna burðarefni.

1.3.2.3 *Fjöldi dýra, skammtastærðir og val burðarefnis*

Nota skal a.m.k. fjögur dýr fyrir hvern skammtahóp og a.m.k. þrjá mismunandi styrkleika af prófunarefninu, svo og neikvæðan samanburðarhóp sem fær aðeins burðarefni prófunarefnis og, eftir því sem við á, jákvæðan samanburð. Í þeim tilvikum þar sem afla á gagna um einstök dýr skulu vera a.m.k. fimm dýr í hverjum skammtahópi. Dýrin í samanburðarhópunum fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í meðferðarhópunum að öðru leyti en því að þau fyrrnefndu fá ekki prófunarefnið.

Val á skammtastærðum og burðarefni skal byggjast á ráðleggingunum sem settar eru fram í 1. heimild. Skammtar eru valdir úr styrkleikaröðinni 100%; 50%; 25%; 10%; 5%; 2,5%; 1%; 0,5% o.s.frv. Taka skal tillit til fyrirbyggjandi gagna um bráð eituhrif og húðertingu, eftir því sem við á, þegar valið er á milli þrenns konar styrkleika þannig að mestu váhrif verði við mesta styrkinn en komist verði hjá útbreiddum eituhrifum og óhóflegri húðertingu (2. og 11. heimild).

Velja skal burðarefni með tilliti til þess að prófunarstyrkur og leysni verði í hámarki og að þannig fáiast jafnframt lausn/sviflausn sem hentar vel til að gefa efnið. Burðarefni sem mælt er með eru þessi og í þessari forgangsörð: aseton/ólífuolífa (4:1 miðað við rúmmál), dímetýlformamíð, metýletýlketon, própýlenglýkól og dímetýlsúlfoxíð (2. og 10. heimild) en nota má önnur efni ef færð eru nægilega vísindaleg rök fyrir því. Í sumum tilvikum getur verið nauðsynlegt að nota leysiefni, sem hentar út frá klíniskri skírskotun, eða efnablönduna, sem prófunarefnið er selt í á markaði, til frekari samanburðar. Sérstaklega þarf að sjá til þess að vatnssækin efni, sem halda húðinni votri og renna ekki strax af, séu höfð með burðarefninu. Þess vegna ber að forðast að nota burðarefni sem eru eingöngu vatnskennd.

1.3.3 **Prófunaraðferð**

1.3.3.1 *Tilraunaáætlun*

Tilraunaáætlunin fyrir greininguna er sem hér segir:

- 1. dagur:

Hvert dýr skal vegið og þyngd þess skráð. 25 µl af hæfilega þynntu prófunarefninu, burðarefninu eingöngu eða jákvæða samanburðarefninu (eftir því sem við á) er borið aftan á bæði eyru dýranna.

- 2. og 3. dagur:

Borið er á dýrin aftur eins og á 1. degi.

- 4. og 5. dagur:

Engin meðferð.

- 6. dagur:

Skráð þyngd hvers dýrs. 250 µl af fosfatjafnaðri saltlausn (PBS) sem inniheldur 20 µCi (7,4 e + 8 Bq) af ³H-metýltýmíðinu er sprautað í rófuþláð allra prófunar- og samanburðarmúsa. Að öðrum kosti er 250 µl af fosfatjafnaðri saltlausn (PBS) sem inniheldur 2 µCi (7,4 e + 7 Bq) af ¹²⁵I-joðdeoxýúridíni og 10⁻⁵ M flúordeoxýúridíni sprautað í rófuþláð allra músanna.

Fimm tímum síðar eru dýrin aflífuð. Þegar dreneitlarnir (draining lymph nodes) á hvoru eyra allra músanna í hverjum tilraunahópi hafa verið fjarlægðir eru eitlarnir hópaðir (pooled) og settir í fosfatjafnaða saltlausn (PBS) (aðferð með hópuðum tilraunahópi). Að öðrum kosti er hægt að fjarlægja eitlapör úr einstökum dýrum og hópa þau í fosfatjafnaðri saltlausn fyrir hvert dýr um sig (stakdýrsaðferðin). Nákvæmar upplýsingar og skýringarmyndir af greiningu og krufningu eitla er að finna í I. viðauka í 10. heimild.

1.3.3.2 *Tilreiðsla frumusviflausna*

Sviflausn með stökum eitilfrumum, annaðhvort úr hópuðu tilraunahópnum eða tvíhliða úr einstökum dýrum, er búin til með vægri, vélrænni aðgreiningu gegnum 200 µm móska net úr ryðfriú stáli. Eitilfrumur eru þvegnar tvisvar með umframagni af fosfatjafnaðri saltlausn og felldar út með 5% triklóredíksýru (TCA) við 4 °C í 18 klst. (2. heimild). Botnfallið er annaðhvort leyst upp aftur í 1 ml af triklóredíksýru og flutt yfir í sindurmælingaglas sem inniheldur 10 ml af sindurvökva fyrir ³H-talningu, eða flutt beint í gammatalningarmælingaglas fyrir ¹²⁵I-talningu.

1.3.3.3 *Ákvörðun á frumufjölgun (upptekin geislavirkni)*

Upptekið ³H-metýltýmíðin er mælt með β-sindurtalningu sem sundrun á mínútu (DPM). Upptekið ¹²⁵I-joðdeoxýúridín er mælt með ¹²⁵I-talningu og er einnig tilgreint sem sundrun á mínútu. Upptakan er gefin upp sem sundrun á mínútu/meðferðarhóp (hópunaraðferð) eða sundrun á mínútu/dýr (stakdýrsaðferð), eftir því hvor aðferðin er notuð.

1.3.3.4 *Athuganir*1.3.3.4.1 *Klínískar athuganir*

Dýrin skulu skoðuð gaumgæfilega einu sinni á dag til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk einkenni hjá dýrunum, annaðhvort staðbundna ertingu á áborna staðnum eða merki um útbreidd eiturhrif. Skrá skal allar athuganir skipulega í sérstakri skrá fyrir hvert dýr.

1.3.3.4.2 *Líkamsþyngd*

Eins og tilgreint er í lið 1.3.3.1 skal vigta hvert dýr við upphaf prófunar og þegar fyrirhugað er að aflifa þau.

1.3.4 **Útreikningur á niðurstöðum**

Niðurstöðurnar eru gefnar sem örvunarstuðull (SI). Þegar hópunaraðferðin er notuð fæst örvunarstuðullinn með því að deila í hópaða, upptekna geislavirkni í hverjum meðferðarhópi með upptökunni hjá hópuðum samanburðarhópi sem fær burðarefni; þannig fæst meðalörvunarstuðull. Þegar stakdýrsaðferðin er notuð fæst örvunarstuðullinn með því að deila í meðaltal sundrunar á mínútu/dýr í hverjum hópi sem fær prófunarefnið og jákvæða samanburðarhópnum með meðaltali sundrunar á mínútu/dýr fyrir leysiefnið/samanburðarhópinn sem fær burðarefni. Meðalörvunarstuðullinn fyrir samanburðarhópinn, sem fær burðarefni, er þá 1.

Þegar örvunarstuðullinn er reiknaður út með stakdýrsaðferðinni er unnt að koma við tölfraðilegri greiningu á gögnunum. Þegar velja skal heppilega aðferð fyrir tölfraðilega greiningu er nauðsynlegt að vera meðvitaður um hugsanlegar misfellur í dreifni og önnur skyld vandamál sem geta gert umbreytingu gagna nauðsynlega eða tölfraðilega greiningu þar sem ekki er tekið tillit til færibreytna. Fullnægjandi aðferð til að túlka gögnin er að meta öll einstök gögn um meðferðarhópa og samanburðarhópa sem fá burðarefni og reikna út frá þeim feril fyrir tengsl skammtastærðar og svörunar fyrir þann skammt sem er heppilegastur að teknu tilliti til öryggismarka (8., 12. og 13. heimild). Rannsakandi þarf þó að hafa varann á gagnvart hugsanlegri „frávíkiskenndri“ svörun hjá einstökum dýrum í hópi, sem getur gert það nauðsynlegt að nota aðrar aðferðir við mat á svörun (t.d. miðgildi í stað meðaltals) eða útiloka frávíkiskenndu svörunina.

Ákvörðunarferlið sem tengist jákvæðri svörun útheimtir örvunarstuðul ≥ 3 , að tekið sé tillit til tengsla skammtastærðar og svörunar og, eftir því sem við á, tölfraðilega marktækni (3., 6., 8., 12. og 14. heimild).

Ef nauðsynlegt reynist að skýra fengnar niðurstöður skal huga að ólíkum eiginleikum prófunarefnisins, þ.m.t. hvort það er skylt þekktum húðnæmum að byggingu, hvort það veldur mikilli húðertingu og eðli tengslanna sem fram koma milli svörunar og skammtastærðar. Fjallað er ítarlega um þetta og önnur atriði annars staðar (7. heimild).

2. **GÖGN**

Gögn skulu sett fram í töfluformi þar sem sýnd eru meðaltalsgildi, einstök gildi fyrir sundrun á mínútu og örvunarstuðlar fyrir hvern skammtahóp (þ.m.t. samanburðarhópar sem fá burðarefni).

3. **SKÝRSLUGJÖF**3.1 **PRÓFUNARSKÝRSLA**

Prófunarskýrslan skal innihalda eftirfarandi upplýsingar:

Prófunarefni:

- gögn til sanngreiningar (t.d. CAS-númer, liggi það fyrir, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),
- eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. rokgirni, stöðugleiki og leysni),
- ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta.

Burðarefni:

- gögn til sanngreiningar (hreinleiki, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað),
- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- músastofninn sem er notaður,
- örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,
- uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,
- fjöldi, aldur og kyn dýranna.

Prófunarskilyrði:

- upplýsingar um tilreiðslu prófunarefnis og hvernig það er borið á,
- rök fyrir vali skammts, þ.m.t. niðurstöður úr rannsóknum til að ákvarða skammtastærð, ef þær hafa verið gerðar, burðarefni og styrkleikar prófunarefnis sem eru notaðir og heildarmagn efnis sem er borið á,
- nákvæmar upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns).

Áreiðanleikakönnun:

- samantekt á niðurstöðum síðustu áreiðanleikakönnunar, þ.m.t. upplýsingar um efni, styrk og burðarefni sem er notað,
- samskiða og/eða rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan og neikvæðan samanburð fyrir rannsóknarstofuna sem framkvæmir prófunina.

Niðurstöður:

- þyngd hvers dýrs við upphaf skömmunar og á áætluðum aflifunardegi,
- tafla yfir meðalsundrun á mínútu (sameiginleg aðferð) og einstök gildi fyrir sundrun á mínútu (einstaklingsaðferð), svo og bilið fyrir gildi úr báðum aðferðum og örvunarstuðlar fyrir hvern skammtahóp (þ.m.t. samanburðarhópur sem fær burðarefni),
- tölfræðileg greining ef við á,
- tíminn þegar eiturrhifa varð vart og hvernig þau þróast, þ.m.t. húðerting á staðnum þar sem efnið var borið á, ef um hana er að ræða, fyrir hvert dýr.

Umræða um niðurstöður.

- Stuttar athugasemdir um niðurstöður, greining á tengslum svörunar og skammtastærðar og tölfræðileg greining, eftir því sem við á, með ályktun um það hvort prófunarefnið skuli teljast húðnæmir.

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) Kimber, I. og Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, 165–169.
- 2) Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W. og Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13–31.

- 3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563–79.
- 4) Testing Method B.6 (prófunaraðferð B.6).
- 5) Chamberlain, M. og Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999–1002.
- 6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. og Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985–997.
- 7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. og Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 327–33.
- 8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49–59.
- 9) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. og Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281–4.
- 10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/ Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11) Testing method B.4 (prófunaraðferð B.4).
- 12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. og Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63–67.
- 13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261–266.
- 14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR og Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344–48.

B.43. RANNSÓKN Á TUGAEITURHRIFUM HJÁ NAGDÝRUM**1. AÐFERÐ**

Þessi aðferð samsvarar OECD TG 424 (1997).

Þessi prófunaraðferð var hönnuð til að fá nauðsynlegar upplýsingar til að staðfesta eða lýsa nánar hugsanlegum taugaeiturhrifum af völdum íðefna hjá fullvöxnum dýrum. Aðferðina má annaðhvort nota ásamt fyrirbyggjandi prófunaraðferðum við rannsóknir á eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf eða beita henni sem sjálfstæðri rannsókn. Mælt er með því að leiðbeiningaskjal OECD um prófunaráætlanir og aðferðir varðandi rannsóknir á taugaeiturhrifum (1. heimild) sé haft til aðstoðar við skipulagningu rannsókna sem byggjast á þessari prófunaraðferð. Það er einkum mikilvægt ef áformað er að gera breytingar á athugunum og prófunaraðferðum sem mælt er með að sé almennt beitt með þessari aðferð. Leiðbeiningaskjalið er samið í því skyni að auðvelda val á öðrum prófunaraðferðum til að nota við sérstakar aðstæður. Þessi aðferð tekur ekki til mats á áhrifum taugaeiturhrifa á þroskun.

1.1 INNGANGUR

Við mat og ákvörðun á eitureiginleikum íðefna er mikilvægt að skoða mátt efnisins til að framkalla taugaeiturhrif. Prófunaraðferðin fyrir útbreidd eiturhrif við endurtekna skammtagjöf felur nú þegar í sér athuganir þar sem hugsanleg taugaeiturhrif eru skimuð. Þessa prófunaraðferð má nota við rannsókn til að fá frekari upplýsingar um, eða staðfesta, taugaeiturhrif sem koma fram í rannsóknum á útbreiddum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf. Athuganir á hugsanlegum taugaeiturhrifum tiltekinnar flokka íðefna geta þó bent til þess að heppilegra sé að ákvarða þau beint með þessari aðferð án þess að leggja til grundvallar áður fengnar vísbendingar um hugsanleg eiturhrif úr rannsóknum á útbreiddum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf. Slíkar athuganir fela t.d. í sér:

- athugun á taugafræðilegum einkennum eða taugameinafræðilegum skemmdum í rannsóknum á eiturhrifum, öðrum en rannsóknum á útbreiddum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf, eða
- skyldleika í byggingu eða aðrar upplýsingar sem tengja efnið við efni sem vitað er að veldur taugaeiturhrifum.

Auk þess geta verið önnur tilvik þar sem þessi prófunaraðferð hentar vel; sjá nánar í 1. heimild.

Þessi aðferð hefur verið þróuð þannig að hægt sé að laga hana að sérstökum þörfum á því að staðfesta sérstök vefjameinafræðileg og atferlisleg taugaeiturhrif íðefnis, svo og að lýsa taugaeiturhrifasvöruninni og hve mikil hún er.

Áður voru taugaeiturhrif lögð að jöfnu við taugakvilla sem fela í sér taugameinafræðilegar skemmdir eða taugafræðilega starfstruflun, s.s. flog, lömun eða skjálfta. Þótt taugakvillar gefi mikilvæga vísbendingu um taugaeiturhrif er nú ljóst að til eru mörg önnur einkenni um eiturhrif í taugakerfinu (t.d. vöntun á samræmi hreyfinga, misbrestur á starfsemi skynfæra, náms- og minnisörðugleikar) sem koma ekki alltaf fram í rannsóknum á taugakvillum eða annars konar rannsóknum.

Þessari aðferð við prófun á taugaeiturhrifum er ætlað að greina helstu taugaatferlis- og taugameinafræðilegu áhrif hjá fullvöxnum nagdýrum. Þótt atferlistengd áhrif, jafnvel þótt ekki sé um formfræðilegar breytingar að ræða, geti endurspeglad skaðleg áhrif á lífverur eru ekki allar breytingar á atferli bundnar taugakerfinu. Þess vegna skulu allar breytingar, sem koma fram, metnar í tengslum við samsvarandi vefjameinafræðileg, blóðfræðileg eða lífefnafræðileg gögn, svo og gögn um aðrar tegundir útbreiddra eiturhrifa. Prófunin, sem gert er ráð fyrir í þessari aðferð og á að segja til um einkenni taugaeiturhrifasvörunar og hve mikil hún er, felur í sér sérstaka, vefjameinafræðilega og atferlislega aðferð sem hægt er að styðja enn frekar með raflífeðlisfræðilegum og/eða lífefnafræðilegum rannsóknum (1., 2., 3. og 4. heimild).

Efni, sem hafa eituráhrif á taugar, geta verkað á marga staði í taugakerfinu og byggst á margs konar gangvirki. Þar eð engin einföld röð prófana er til þar sem hægt er að meta vandlega taugaeiturhrifamátt allra efna getur verið nauðsynlegt að nota aðrar prófanir í lífi eða í glasi sem eru sérstaklega gerðar fyrir þá tegund taugaeiturhrifa sem hefur komið í ljós eða gert er ráð fyrir.

Einnig er hægt að nota þessa prófunaraðferð í tengslum við leiðbeiningarnar sem settar eru fram í leiðbeiningaskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófunaráætlanir og aðferðir varðandi taugaeiturhrif (1. heimild) til að hanna rannsóknir sem er ætlað að lýsa sérstaklega eða auka næmleika varðandi megindlega ákvörðun á tengslum svörunar og skammtastærðar með það fyrir augum að geta betur metið styrk þar sem engin merkjanleg, skaðleg áhrif verða eða að færa sönnur á þekkta eða hugsanlega hættu sem stafar af íðefninu. Til dæmis má hanna rannsóknir með það fyrir augum að sanngreina og meta gangvirki taugaeiturhrifa eða auka við gögn sem liggja þegar fyrir úr taugaatferlislegum og taugameinafræðilegum grunnrannsóknum.

Slíkar rannsóknir þurfa ekki að gefa sömu niðurstöður og fengjust með því að nota þær stöðluðu aðferðir sem mælt er með í þessari aðferð ef slík gögn eru þegar fyrirleggjandi og eru ekki talin nauðsynleg fyrir túlkun á niðurstöðum rannsóknarinnar.

Þessi rannsókn á taugaeiturhrifum, ein sér eða ásamt öðrum, veitir upplýsingar sem geta:

- gefið til kynna hvort taugakerfið hefur orðið fyrir varanlegum áhrifum eða áhrifum, sem ganga til baka, af efninu sem er til prófunar,
- orðið þáttur í lýsingu á breytingum í taugakerfinu sem tengjast váhrifum frá efninu og aukið skilning á því gangvirki sem liggur að baki,
- ákvarðað tengsl svörunar, tíma og skammtastærðar með það fyrir augum að finna þann styrk sem hefur engin merkjanleg, skaðleg áhrif (sem nota má til þess að ákvarða öryggisviðmiðanir fyrir iðefnið).

Við prófun með þessi aðferð er prófunarefnið gefið um munn. Aðrar íkomuleiðir (t.d. um húð eða með innöndun) geta verið heppilegri og þá getur þurft að breyta þeim aðferðum sem mælt er með. Þegar velja á íkomuleið skal huga að upplýsingum um váhrifamyndina að því er varðar menn og fyrirleggjandi upplýsingum um eiturefna- eða hvarfafræði.

1.2 SKILGREININGAR

Skaðleg áhrif: meðferðartengd breyting frá grunnviðmiðun sem minnkar hæfni lífveru til að lifa af, fjölga sér eða laga sig að umhverfinu.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd (g, mg) prófunarefnis eða sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg) eða sem stöðugur styrkur í föðri (milljónarhlutar, ppm).

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

Taugaeiturhrif: skaðleg breyting í byggingu eða starfsemi taugakerfisins sem stafar af váhrifum efnafræðilegs, líffræðilegs eða eðlisfræðilegs áhrifavalds.

Efni sem hefur eituráhrif á taugar: efnafræðilegur, líffræðilegur eða eðlisfræðilegur áhrifavaldur sem getur valdið taugaeiturhrifum.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“, þ.e. stærsti skammturinn sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum.

1.3 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er gefið um munn og notaðir eru nokkrir hópar nagdýra sem fá nokkra misstóra skammta. Yfirleitt er nauðsynlegt að endurtaka skammtagjöf og skömmtunartímabilið getur staðið yfir í 28 daga en 90 daga við hálflangvinn eiturhrif og 1 ár eða lengur við langvinn eiturhrif. Aðferðirnar, sem lýst er hér, má einnig nota við rannsókn á bráðum taugaeiturhrifum. Dýrin eru prófuð til að unnt sé að greina eða lýsa atferlistengdum og/eða taugafræðilegum afbrigðum. Á hverju skoðunartímabili er lagt mat á ýmiss konar atferli sem eiturefni, sem hafa áhrif á taugar, geta haft áhrif á. Við lok prófunarinnar er undirhópur dýra úr hverjum hópi og af hvoru kyni settur í gegnflæði (perfused) á staðnum og sýni úr heila, mænu og úttaugum tekin og rannsökuð.

Þegar rannsóknin er gerð sem sjálfstæð rannsókn til að skima eftir taugaeiturhrifum eða til að lýsa eðli taugaeiturhrifa er hægt að nota dýr úr öllum hópum, sem eru ekki notaðir til gegnflæðis og síðari, vefjameinafræðilegra rannsókna (sjá töflu 1), til sértækra rannsókna með taugaatferlislegum, taugameinafræðilegum, taugaefnafræðilegum eða raflífeðlisfræðilegum aðferðum sem geta aukið við gögnin sem fást með venjulegum rannsóknum samkvæmt þessari aðferð (1. heimild). Þessar viðbótaraðferðir geta verið sérlega gagnlegar þegar reynsluathuganir eða áhrif, sem vænst er, benda til sérstakrar tegundar efnafræðilegra taugaeiturhrifa eða að þau hafi sérstakt mark (target). Að öðrum kosti er hægt að nota dýrin, sem eftir verða, við mat eins og það sem gert er ráð fyrir í prófunaraðferðunum fyrir rannsóknir á eiturhrifum í nagdýrum sem fá endurtekna skammta.

Þegar aðferðirnar í þessari prófunaraðferð er sameinaðar öðrum prófunaraðferðum þarf að hafa nægilega mörg dýr til að unnt sé að uppfylla kröfurnar um athuganir í báðum rannsóknum.

1.4 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1 Val á dýrategund

Rottur eru ákjósanlegustu tilraunadýrin þótt nota megi önnur nagdýr, en þá skal færa rök fyrir því. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofni. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Skammtagjöf skal að jafnaði hefjast eins fljótt og hægt er eftir fráfærur, helst ekki síðar en við sex vikna aldur og í öllum tilvikum áður en þau ná níu vikna aldri. Ef þessi rannsókn er sameinuð öðrum rannsóknum getur þó þurft að aðlagja þessar kröfur um aldursmörk. Í upphafi rannsóknarinnar skulu frávik í þyngd dýranna ekki víkja meira en $\pm 20\%$ frá meðalþyngd hvors kyns um sig. Þegar rannsókn með endurteknum skammti í skamman tíma er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sama stofni og uppruna í báðum rannsóknum.

1.4.2 Aðbúnaður og fóðrun

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera $22 (\pm 3) ^\circ\text{C}$. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjöraki 50 – 60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis myrkur og birtu, 12 klukkustundir í senn. Halda skal miklum, breytilegum hávaða í lágmarki. Nota má fóður sem er venjulega notað á rannsóknarstofum ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fõðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunarefni í fõðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Dýrin má hafa hvert í sínu búri eða litla hópa af sama kyni saman í búri.

1.4.3 Dýrin undirbúin

Heilbrigð, ung dýr eru valin af handahófi í meðferðar- og samanburðarhópum. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru merkt, hvert um sig, og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.4 Íkomuleið og tilreiðsla skammta

Í þessari prófunaraðferð er sérstaklega gert ráð fyrir að prófunarefnið sé gefið um munn. Gefa má prófunarefni um munn með magaslöngu, í fõðri, drykkjarvatni eða í hylkjum. Nota má aðrar íkomuleiðir (t.d. um húð eða með innöndun) en þá getur þurft að breyta þeim aðferðum sem mælt er með. Þegar velja á íkomuleið skal huga að upplýsingum um váhrifamyndina að því er varðar menn og fyrirliggjandi upplýsingum um eiturefna- eða hvarfafræði. Tilgreina skal rök fyrir vali á íkomuleið og einnig þeim breytingum sem þá eru gerðar á aðferðunum sem gert er ráð fyrir í þessari prófunaraðferð.

Ef nauðsyn krefur má hafa prófunarefnið uppleyst eða sem sviflausn í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/sviflausnir í vatni en að öðrum kosti lausnir/sviflausnir í olíu (t.d. maisolíu) en að þeim slepptum geta lausnir/sviflausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Eitureiginleikar burðarefnisins verða að vera þekktir. Auk þess skal hafa í huga eftirfarandi eiginleika burðarefnisins: áhrif burðarefnisins á frásog, dreifingu, efnaskipti eða geymd prófunarefnisins sem kunna að breyta eitureiginleikum þess, svo og áhrif þess á fõðurát og vatnsdrykkju eða á næringarástand dýranna.

1.5 AÐFERÐIR

1.5.1 Fjöldi og kyn dýranna

Ef rannsóknin er sjálfstæð rannsókn skulu vera a.m.k. 20 dýr (10 kvendýr og 10 karldýr) í hverjum skammta- og samanburðarhópi með tilliti til mats á nákvæmum, klínískum og starfrænum athugunum. Að minnsta kosti fimm karldýr og fimm kvendýr, sem valin eru úr þessum 10 karldýrum og 10 kvendýrum, skulu sett í gegnflæði á staðnum og notuð til nákvæmra rannsókna á taugavefjameinafræði við lok rannsóknarinnar. Í tilvikum þar sem aðeins takmarkaður fjöldi dýra í tilteknum skammtahópi er skoðaður með tilliti til þess hvort merki sjáist um taugaeiturhrif skal vega og meta hvort taka eigi þessi dýr með í hópinn sem settur er í gegnflæði.

Ef rannsóknin fer fram ásamt rannsókn á eiturrhifum við endurtekna skammta verður að nota svo mörg dýr að unnt sé að ná markmiðum beggja rannsókna. Lágmarksfjöldi dýra í hverjum hópi með mismunandi samsetningu rannsókna er tilgreindur í töflu 1. Ef áform eru um aflifun dýra í tilrauninni eða um að setja upp batahópa fyrir athugun á afturkræfni, varanleika eða tafinni framkomu eiturrhifa eftir meðferð eða ef frekari athuganir eru íhugaðar skal fjölga tilraunadýrum til að tryggja að dýr, sem þarf að nota til athugana og vefjameinafræðilegra rannsókna, séu nægilega mörg.

1.5.2 Meðferðar- og samanburðarhópur

Almennt skal nota a.m.k. þrjá skammtahópa og samanburðarhóp en ef mat á öðrum gögnum gefur ekki ástæðu til að vænta megi neinna áhrifa af endurteknum skammti sem er 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag er má framkvæma markprófun. Ef engin heppileg gögn liggja fyrir má gera rannsókn til að ákvarða skammtastærð til að auðveldara sé að ákvarða hvaða skammtastærðir skuli nota. Dýrin í samanburðarhópnum fá nákvæmlega sömu meðferð og dýrin í tilraunahópnum að öðru leyti en því að þau fá ekki prófunarefnið. Ef burðarefni er notað þegar prófunarefnið er gefið skal samanburðarhópurinn fá stærsta skammt sem er notaður af burðarefninu.

1.5.3 Áreiðanleikakönnun

Rannsóknarstofan, sem framkvæmir rannsókna, skal leggja fram gögn sem sýna hæfni hennar til að framkvæma rannsókna og næmi aðferðanna sem eru notaðar. Slik gögn skulu færa sönnur á getu til að greina og magngreina, eftir því sem við á, breytingar í hinum ýmsu endapunktum sem mælt er með að verði skoðaðir, s.s. ósjálfráðum merkjum, starfsemi skynfæra, gripstyrk og hreyfistarfsemi. Upplýsingar um efni, sem valda mismunandi taugaeitursvörum og nota má sem jákvæðan samanburð, er að finna í 2. til 9. heimild. Nota má rannsóknarsöguleg gögn ef grunnþættir tilraunaaðferðarinnar eru þeir sömu. Mælt er með því að rannsóknarsöguleg gögn séu uppfærð reglulega. Leggja skal fram ný gögn sem staðfesta áframhaldandi næmi aðferðarinnar ef rannsóknarstofan, sem framkvæmir prófunina, hefur breytt einhverjum veigamiklum þáttum í aðferðunum eða framkvæmd prófunarinnar.

1.5.4 Val á skammti

Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum eldri gögnum um fram komin eiturrhif og hvarfafræði prófunarefnisins eða skyldra efna. Stærsti skammturinn er valinn með það fyrir augum að hann kalli fram taugaeiturrhif eða skýr, útbreidd eiturrhif. Eftir það eru valdir skammtar sem fara stigminnkandi til að sýna fram á tengsl svörunar og skammtastærðar og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð. Að jafnaði skal velja skammta þannig að greina megi milli fyrstu eiturrhifa á taugakerfið og áhrifa sem tengjast útbreiddum eiturrhifum. Oft er ákjósanlegt að hafa bilin 2 – 3 og yfirleitt er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að hafa mjög stór bil milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum tíu). Ef til er skynsamlegt mat á váhrifum á menn skal einnig taka tillit til þess.

1.5.5 Markprófun

Ef engin merkjanleg, skaðleg taugaeiturrhif koma fram í rannsókn með einni skammtastærð sem er a.m.k. 1 000 mg/kg líkamsþyngdar á dag og ef ekki er búist við eiturrhifum samkvæmt gögnum um efni, sem er skylt að byggingu, kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónaúðsynleg. Þau váhrif, sem líklegt er að menn verði fyrir, geta valdið því að nota þurfi stærri skammta við gjöf um munn í ikomuleið er önnur, t.d. innöndun eða um húð, geta eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnisins oft gefið til kynna hver hámarksskammturinn megi vera. Við rannsókn á bráðum eiturrhifum (efni gefið um munn) skal markprófunarskammturinn vera a.m.k. 2 000 mg/kg.

1.5.6 Gjöf skammta

Dýrin fá skammt af prófunarefninu daglega, sjö daga vikunnar í a.m.k. 28 daga; ef efnið er gefið 5 daga vikunnar eða váhrifatímabilið er styttra skal færa gild rök fyrir því. Ef prófunarefnið er gefið með inngjafarslöngu skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða heppilegri inndælingarpípu.

Stærð prófunardýrsins ræður því hve mikinn vökva má gefa inn í einu. Rúmmálið skal ekki vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar. Þegar um er að ræða vatnslausnir geta þó 2 ml/100 g líkamsþyngdar komið til greina. Að undanskildum ertandi eða ætandi efnum, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkurinn er meiri, skal halda rúmmáli efnisins sem jöfnustu með því að stilla styrkinn þannig að rúmmálið haldist stöðugt hver sem skammturinn er.

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með föðri eða drykkjarvatni er áriðandi að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- eða vökvajafnvægi. Þegar prófunarefni er gefið inn með föðri á annaðhvort að nota fastan styrk (í milljónarhlutum) eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna; taka skal fram hvor leiðin er farin. Ef efnið er gefið með magaslöngu skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann eftir þörfum þannig að skammtastærð sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Þegar rannsókn með endurteknum skömmtum er undanfari langtímarannsóknar skal föðrið vera það sama í báðum rannsóknum. Ef um er að ræða rannsókn á bráðum eiturhrifum og ekki er hægt að gefa allan skammtinn í einu lagi má gefa hann inn í smærri hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

1.6 ATHUGANIR

1.6.1 Tíðni athugana og prófana

Í rannsóknum á endurteknum skammti skal athugunartímabilið ná yfir allt skammtatímabilið. Í rannsóknum á bráðum eiturhrifum skulu athuganir standa yfir í aðra 14 daga eftir að meðferð lýkur. Dýr í fylgihópum, sem eru látin vera án váhrifa á eftirmeðferðartímabilinu, skulu einnig athuguð á þessu tímabili.

Athuganir skulu gerðar nægilega þétt til að hámarkslíkur séu á því að greina megí hvers konar atferlistengd og/eða taugafræðileg frávik. Helst á að gera athuganir á sama tíma á hverjum degi og með það í huga hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöf. Yfirlit yfir tíðni klínískra athugana og starfrænna prófana er í töflu 2. Ef hvarfafræðileg gögn eða önnur gögn, sem eru unnin úr fyrri rannsóknum, benda til þess að athuganir, prófanir eða athuganir að loknu skammtatímabili þurfi að fara fram á öðrum tímum skal setja aðra tímaáætlun með það fyrir augum að ná fram sem mestum upplýsingum. Ef tímaáætlun er breytt skal það rökstutt.

1.6.1.1 *Athuganir á almennu heilbrigðisástandi og dauðsföllum/veikindatilvikum*

Öll dýr skulu athuguð vandlega a.m.k. einu sinni á dag með tilliti til heilsufars og a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til dauðsfalla og veikindatilvika.

1.6.1.2 *Nákvæmar klínískar athuganir*

Gera skal nákvæmar klínískar athuganir á öllum dýrum sem hafa verið valin í þeim tilgangi (sjá töflu 1), einu sinni fyrir fyrstu skammtagjöf (svo að koma megí við samanburði hjá hverju einstöku dýri) og með mismunandi millibili eftir það, sem ræðst af lengd rannsóknarinnar (sjá töflu 2). Gera skal nákvæmar, klínískar athuganir á fylgihópum sem eru batahópar við lok batatímabilsins. Gera skal nákvæmar klínískar athuganir utan búrs dýranna í stöðluðu rými. Þær skulu vandlega skráðar og nota skal stigakerfi sem felur í sér viðmiðanir eða kvarða fyrir hverja mælingu í athugunum. Rannsóknarstofan skal skilgreina á skýran hátt viðmiðanir eða kvarðana sem eru notuð. Leitast skal við að tryggja að skilyrðin við prófanir séu sem jöfnust (ekki tengdar meðferðinni á kerfisbundinn hátt) og æskilegt er að þeir sem athuga dýrin þekki ekki til raunverulegu meðferðarinnar.

Mælt er með því að athuganirnar séu gerðar eftir föstu formi þar sem vel skilgreindum viðmiðunum (þ.m.t. skilgreining á því sem telst venjulegt „svið“) er kerfisbundið beitt á hvert dýr í hvert skipti sem athugun fer fram. „Venjulegt svið“ skal skjalfest skilmerkilega. Öll sýnileg merki skulu skráð. Einnig skal skrá umfang sýnilegra merkja ef ástæða þykir til þess. Klínískar athuganirnar skulu m.a. en ekki einvörðungu beinast að breytingum í húð, feldi, augum, slímhúð, merkjum um seyti og útskilnað og ósjálfráðri starfsemi (t.d. táramyndun, hárisi, stærð sjáaldurs, óeðlilegu öndunarmynstri og/eða öndun um munn, öllum óeðlilegum merkjum um þvaglát eða hægðir og litarbreytingum í þvagi).

Einnig skal gefa gaum að öllum óvenjulegum svörum að því er varðar líkamsstöðu, virkni, t.d. minnkun eða aukin könnun á staðlaða rýminu) og samræmi hreyfinga. Skrá skal breytingar á göngulagi (t.d. kjag, slingur), líkamsstöðu (t.d. kryppa) og viðbrögð við meðhöndlun, staðsetningu eða öðru umhverfisáreiti, svo og hreyfingar sem stafa af vöðvakippum eða vöðvaspennu, krampa eða skjálfta, staglkennt atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu, gera óvenjulegar höfuðhreyfingar eða ganga stöðugt í hringi) eða undarlega hegðun (t.d. ef dýrin bíta eða sleikja sig óhóflega, skaða sig sjálf, ganga afturábak, gefa frá sér hljóð) eða sýna árásarhneigð.

1.6.1.3 Starfrænar prófanir

Starfrænar prófanir skulu, líkt og nákvæmar, klínískar athuganir, einnig fara fram einu sinni áður en skammtar eru gefnir og oft eftir það á öllum dýrum sem hafa verið valin í þeim tilgangi (sjá töflu 1). Tíðni starfrænna prófana fer einnig eftir því hve lengi rannsóknin stendur yfir (sjá töflu 2). Auk skoðunartímabíla, sem sett eru fram í töflu 2, skulu starfrænar athuganir á fylgihópum, sem eru batahópar, einnig gerðar svo nærri aflífun í lok rannsóknarinnar sem framast er kostur. Starfrænar prófanir skulu fela í sér mat á viðbrögðum skynfæra við áreiti af ýmsu tagi (t.d. heymar-, sjón-, og hreyfi- og stöðuskynáreiti (5., 6. og 7. heimild)), á gripstyrk (8. heimild) og á hreyfistarfsemi (9. heimild). Hreyfistarfsemi skal mæld sjálfvirkum búnaði sem getur numið bæði minnkun og aukningu í starfseminni. Ef annað skilgreint kerfi er notað skal það vera megindlegt og sýna verður fram á næmi þess og áreiðanleika. Prófa skal sérhvert tæki til að tryggja áreiðanleika til langs tíma og samkvæmni á milli tækja. Nánari lýsingu á aðferðunum, sem fylgja má, er að finna í þeim heimildum sem vísað er til. Ef engin gögn eru til (þ.e. um byggingu og virkni, faraldsfræðileg gögn og aðrar rannsóknir í eiturefnafræði) sem benda til þess að um taugaeiturhrif sé að ræða er rétt að vega og meta hvort gera skuli sérhæfðari rannsóknir á starfsemi skynfæra og hreyfistarfsemi eða hæfileikanum til að læra og muna til að rannsaka nánar hvort um slík áhrif sé að ræða. Nánari upplýsingar um sérhæfðari prófanir og notkun þeirra er að finna í 1. heimild.

Í undantekningartilvikum má sleppa dýrum úr prófun ef þau bera merki um eiturhrif í þeim mæli að það myndi trufla starfrænu prófanirnar verulega. Færa skal rök fyrir því ef dýrum er sleppt úr prófun á starfrænum þáttum.

1.6.2 Líkamsþyngd og fôðurát/vatnsdrykkja

Í rannsóknum, sem standa allt að 90 daga, skulu öll dýr vegin a.m.k. einu sinni í viku og fôðurát þeirra mælt (og vatnsdrykkja ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni) a.m.k. vikulega. Í langtíma-rannsóknum skulu öll dýr vegin a.m.k. einu sinni í viku fyrstu 13 vikurnar og a.m.k. fjórðu hverja viku eftir það. Mæla skal fôðurát (og vatnsdrykkju ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni) a.m.k. vikulega fyrstu 13 vikurnar og síðan á u.þ.b. þriggja mánaða fresti nema breytingar á heilbrigðisástandi eða líkamsþyngd gefi tilefni til annars.

1.6.3 Augnlæknisfræði

Í rannsóknum, sem standa lengur en 28 daga, skal fara fram augnskoðun, með augnspegli eða öðru jafngildu tæki sem hentar, áður en prófunarefnið er gefið og í lok rannsóknarinnar og helst skal skoða öll dýrin, en a.m.k. dýrin í þeim hópi sem fær stærsta skammtinn og í samanburðarhópnum. Ef breytingar greinast í augum dýranna, eða ef klínísk einkenni benda til að þess þurfi, skulu öll dýrin skoðuð. Í langtímarannsóknum skal augnlæknisfræðileg rannsókn einnig fara fram eftir 13 vikur. Ekki þarf að gera augnlæknisfræðilegar rannsóknir ef slík gögn eru þegar fyrir hendi úr öðrum rannsóknum sem eru svipaðar að lengd og skammtastærðir svipaðar.

1.6.4 Blóðfræði og klínísk lífefnafræði

Ef rannsókn á taugaeiturhrifum fer fram ásamt rannsókn á útbreiddum eiturhrifum við endurtekna skammtagið skulu blóðfræðilegar rannsóknir og klínískar, lífefnafræðilegar mælingar gerðar samkvæmt tilsvareandi aðferð við rannsókn á útbreiddum eiturhrifum. Sýnataka skal fara fram á þann hátt að öll hugsanleg áhrif á taugafræðilegt atferli séu í lágmarki.

1.6.5 Vefjameinafræði

Taugameinafræðileg rannsókn skal gerð með það fyrir augum að vera til fyllingar og aukningar þeim athugunum sem eru gerðar í þeim hluta rannsóknarinnar sem gerðar eru í lífi. Vefir úr a.m.k. 5 dýrum af hvoru kyni og úr hverjum hópi (sjá töflu 1 og næstu málsgrein) skulu festir á staðnum og notuð almennt viðurkennd tækni við gegnflæði og festingu (sjá 5. kafla 3. heimildar og 50. kafla 4. heimildar). Allar merkjanlegar stórsæjar breytingar skulu skráðar.

Ef rannsókn fer fram sem sjálfstæð rannsókn þar sem skimað er eftir taugaeiturhrifum eða til að greina eðli taugaeiturfræðilegra áhrifa má nota þau dýr sem eftir eru til sérstakra rannsókna með taugaatferlislegum (10. og 11. heimild), taugameinafræðilegum (10., 11., 12. og 13. heimild), taugaeinafræðilegum (10., 11., 14. og 15. heimild) eða raflifeðlisfræðilegum (10., 11., 16. og 17. heimild) aðferðum sem geta komið til viðbótar við aðferðirnar og rannsóknirnar sem er lýst hér eða til að fjölga dýrum sem eru rannsökuð í vefjameinafræðilegum rannsóknum. Þessar viðbótaraðferðir eru mjög gagnlegar þegar reynsluathuganir eða áhrif, sem vænst er, benda til sérstakrar tegundar taugaeiturhrifa eða sérstaks marks eiturhrifa (2. og 3. heimild). Einnig er hægt að nota það sem eftir er af dýrunum í venjubundið, meinafræðilegt mat eins og lýst er í aðferðinni fyrir rannsóknir á endurteknum skömmtum.

Öll vefjasýni, sem eru steipt í paraffín, skulu lituð með staðlaðri aðferð, t.d. með hematoxýlíni og eósíni, og rannsökuð í smásjá. Ef merki finnast um úttaugakvilla eða grunur leikur á um slíkt skal rannsaka vef úr úttaug, steiptan í plast. Klínísk merki geta einnig gefið til kynna að rannsaka þurfi fleiri staði eða beita sérstöku litunaraðferðum. Leiðbeiningar um viðbótarstaði, sem rannsaka þarf, er að finna í 3. og 4. heimild. Einnig getur verið gott að nota sérstaka, heppilega litun til að staðfesta tilteknar tegundir meinafræðilegra breytinga (18. heimild).

Dæmigerðir hlutar úr miðtaugakerfinu og úttaugakerfinu skulu rannsakaðir vefjafræðilega (sjá 5. kafla 3. heimildar og 50. kafla 4. heimildar). Svæðin sem skulu að jafnaði rannsökuð eru: framheilinn, miðja stórheilans, þ.m.t. sneið í gegnum drekann, miðheilinn, litli heilinn, heilabruin, mænukylfan, augað ásamt sjóntaug og sjónhimnu, mænan við háls- og lendahluta, mænuhnoðun, taugaþræðir úr afturrót og framrót mænu, nærlæg settaug, nærlæg sköflungstaug (við hnéð) og greinar sköflungstaugarinnar í vöðva kálfans. Sneiðar, sem eru teknar af mænu og úttaugum, skulu teknar bæði með þver- og langskurði. Veita skal æðaskipan taugakerfisins sérstaka athygli. Einnig skal rannsaka sýni úr beinagrindarvöðva, einkum úr kálfavöðvanum. Frumu- og þráðabygging og mynstur á stöðum í mið- og úttaugakerfinu, sem vítað er að verða sérstaklega fyrir áhrifum eiturefna sem hafa áhrif á taugar, skulu skoðuð sérstaklega vel.

Leiðbeiningar varðandi taugameinafræðilegar breytingar, sem venjulega orsakast af váhrifum eiturefnis, er að finna í 3. og 4. heimild. Mælt er með þrepkiptri rannsókn á vefjasýnum þar sem sneiðar úr hópnum, sem fær stærsta skammt prófunarefnis, eru fyrst bornar saman við sneiðar úr samanburðarhópnum. Ef engar taugameinafræðilegar breytingar eru merkjanlegar í sýnum úr þessum hópnum er ekki þörf á frekari greiningu. Ef taugameinafræðilegar breytingar koma í ljós í hópnum sem fær stærsta skammt prófunarefnisins skulu sýni úr öllum vefjum hópanna sem fengu miðlungsstöran eða lítinn skammt, sem geta hugsanlega hafa orðið fyrir áhrifum, merkt og rannsökuð eftir röð.

Ef merki sjást um taugameinafræðilegar breytingar í eigindlegu rannsókninni skal önnur rannsókn fara fram á öllum svæðum taugakerfisins þar sem þessara breytinga hefur orðið vart. Sneiðar úr öllum skammtahópum af hverju og einu svæði, sem hefur hugsanlega orðið fyrir áhrifum, skulu merktar með kóða og rannsakaðar af handahófi án vitneskju um merkinguna. Skrá skal tíðni allra vefjaskemmda og hve alvarlegar skemmdirnar eru. Þegar öll svæði allra skammtahópa hafa verið metin má rjúfa kóðann og láta tölfraðilega greiningu fara fram til að meta tengsl skammtastærðar og svörunar. Fyrir hverja skemmd skal lýsa misalvarlegum dæmum um vefjaskemmdir.

Taugameinafræðilegar niðurstöður skulu metnar með tilliti til athugana og mælinga á atferli og einnig til annarra gagna úr fyrri rannsóknum og samskeiða rannsóknum á útbreiddum eiturhrifum prófunarefnisins.

2. GÖGN

2.1 ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Fyrir hvern prófunarhóp eða samanburðarhóp skal auk þess taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern hóp í prófuninni, fjöldi dýra við upphaf prófunarinnar, fjöldi dýra sem drepast meðan á prófun stendur eða eru aflífuð af mannúðarástæðum, tíminn þegar þau drápust eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, fjöldi þeirra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem sjást um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau standa og hve alvarleg eiturhrifin eru, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, hvers eðlis vefjaskemmdirnar eru og hve alvarlegar þær eru.

2.2 MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Niðurstöður þessarar rannsóknar skulu metnar á grundvelli fjölda tilvika, alvarleika og fylgni milli taugafræðilegs atferlis og taugameinafræðilegra áhrifa (taugaefnafræðilegra eða raflifeðlisfræðilegra áhrifa ef viðbótarannsóknir teljast með) og allra annarra skaðlegra áhrifa sem koma fram. Ef unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri, tölfræðilegri aðferð. Velja skal tölfræðiaðferðir um leið og snið rannsóknarinnar er ákveðið.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- eðlisástand (þ.m.t. myndbrigði, hreinleiki og eðlisefnafræðilegir eiginleikar),
- gögn til sanngreiningar.

Burðarefni (ef við á):

- rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

- tegund/stofn dýra,
- fjöldi, aldur og kyn dýranna,
- uppruni, aðbúnaður, aðlögun, föður o.s.frv.,
- þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

- lýsing á samsetningu prófunarefnisins eða tilreiðslu fóðursins, styrkleikar sem nást, stöðugleiki og einsleitni blöndunnar,
- upplýsingar um gefna skammta, þ.m.t. upplýsingar um burðarefni, magn og eðlisástand efnisins sem er gefið,
- upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,
- rök fyrir vali á skammtastærð,
- rök fyrir íkomuleið og hve lengi skömmun stendur yfir,
- umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fôðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,
- upplýsingar um gæði fôðurs og vatns.

Sköðun og prófunaraðferðir:

- upplýsingar um það hvernig dýr hafa verið valin úr hverjum hópi í undirhópa til gegnflæðis,
- upplýsingar um stigagjafakerfi, þ.m.t. viðmiðanir og stigakvarðar fyrir hverja mælingu í sundurliðuðu, klínísku athugunum,

- upplýsingar um starfrænar prófanir á viðbrögðum við áreiti af ýmsu tagi (t.d. hljóð- eða sjónrænt áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri), prófanir til að meta gripstyrk og mat á hreyfistarfsemi (þ.m.t. upplýsingar um sjálfvirkan búnað sem er notaður til mælinga) og aðrar aðferðir sem beitt er,
- upplýsingar um augnlæknisfræðilegar rannsóknir og, ef við á, blóðfræðilegar rannsóknir og klínískar lífefnafræðirannsóknir með viðeigandi viðmiðunargildum,
- upplýsingar um sérstakar aðferðir sem varða taugafræðilegt atferli, taugameinafræði, taugaefnafræði eða raflifeðlisfræði.

Niðurstöður:

- líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd, þ.m.t. líkamsþyngd við aflífun,
- fæðurát og vatnsdrykkja, eftir því sem við á,
- upplýsingar um eiturefnasvörun eftir kyni og skammtastærð, þ.m.t. merki um eiturhrif eða dauði,
- eðli, alvarleiki og varanleiki (hvenær þeirra verður vart, hvernig þau þróast) þeirra atriða sem koma fram við nákvæma, klíníska athugun (hvort þau ganga til baka eða ekki),
- nákvæm lýsing á öllum niðurstöðum starfrænna prófana,
- niðurstöður krufningar,
- nákvæm lýsing á öllum taugaatferlislegum, taugameinafræðilegum og taugaefnafræðilegum niðurstöðum eða raflifeðlisfræðilegum niðurstöðum, liggi þær fyrir,
- gögn um frásög og efnaskipti, liggi þau fyrir,
- tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umræða um niðurstöður:

- upplýsingar um tengsl svörunar og skammtastærðar,
- tengsl annarra eiturhrifa við niðurstöður varðandi taugaeiturhrifamátt prófunarefnisins,
- skammtastærð sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum áhrifum.

Niðurstöður:

- hvatt er til sérstakrar yfirlýsingar um taugaeiturhrif prófunarefnisins í heild.

4. **HEIMILDASKRÁ**

- 1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, París. Í vinnslu
- 2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Í vinnslu.
- 3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- 4) Spencer, P.S. og Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Ritsstj. Spencer, P.S. og Schaumburg, H.H. Williams and Wilkins, Baltimore/ London.
- 5) Tupper, D.E. og Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

- 6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691–704.
- 7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. og Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- 8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. og Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233–236.
- 9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. og MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599–609.
- 10) Tilson, H.A., og Mitchell, C.L. ritstj. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
- 11) Chang, L.W., ritstj. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
- 12) Broxup, B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689–695.
- 13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. og MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343–352.
- 14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 445–452.
- 15) O'Callaghan J.P. og Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368–378.
- 16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. og Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ritstj. Raven Press, New York, bls. 299–335.
- 17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. og Schaumburg, H.H. ritstj., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, bls. 726–742.
- 18) Bancroft, J.D. og Steven A. (1990). *Theory and Practice of Histological Techniques*. 17. kaffli, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James og Cox, Gordon ritstj. Churchill Livingstone.

Tafla 1

Lágmarksfjöldi dýra sem þarf að vera í hverjum hópi þegar rannsókn á taugaeiturhrifum fer fram, sem sjálfstæð rannsókn eða í tengslum við aðrar rannsóknir

	ÝMSAR ÚTFÆRSLUR RANNSÓKNAR Á TAUGAEITURHRIFUM			
	Sjálfstæð rannsókn	Rannsóknin er sameinuð 28 daga rannsókninni	Rannsóknin er sameinuð 90 daga rannsókninni	Rannsóknin er sameinuð rannsókninni á langvinnnum eiturhrifum
Heildarfjöldi dýra í hverjum hópi	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr	15 karldýr og 15 kvendýr	25 karldýr og 25 kvendýr
Fjöldi dýra sem er valinn til starfrænna prófana, þ.m.t. til nákvæmra, klínískra athugana	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr
Fjöldi dýra sem er valinn fyrir gegnflæði á staðnum og vegna taugavefjameinafræðilegra rannsókna	5 karldýr og 5 kvendýr	5 karldýr og 5 kvendýr	5 karldýr og 5 kvendýr	5 karldýr og 5 kvendýr
Fjöldi dýra sem er valinn fyrir athuganir á endurtekinni skammtagjöf, hálflangvinnnum eða langvinnnum eiturhrifum, fyrir blóð-rannsóknir, klínískar lífefnafræðirannsóknir, vefjameinafræðilegar rannsóknir o.s.frv. samkvæmt viðeigandi leiðbeiningum		5 karldýr og 5 kvendýr	10 karldýr [†] og 10 kvendýr [†]	20 karldýr [†] og 20 kvendýr [†]
Viðbótarathuganir, eftir því sem við á	5 karldýr og 5 kvendýr			

[†] Þ.m.t. eru fimm dýr sem valin eru fyrir starfrænar prófanir og nákvæmar klínískar athuganir sem eru hluti af rannsókninni á taugaeiturhrifum

Tafla 2

Tíðni klínískra athugana og starfrænna prófana

Tegund athugunar		Tímalengd rannsóknar			
		Athugun á bráðum eiturrhifum	28 daga athugun	90 daga athugun	Athugun á langvinnum eiturrhifum
Á öllum dýrum	Almennt heilbrigðisástand	daglega	daglega	daglega	daglega
	Dauðsföll/veikinda-tilvik	tvisvar á dag	tvisvar á dag	tvisvar á dag	tvisvar á dag
Á dýrum sem eru valin til starfrænna athugana	Nákvæmar, klínískar athuganir	— fyrir fyrstu skammtagjöf	— fyrir fyrstu skammtagjöf	— fyrir fyrstu skammtagjöf	— fyrir fyrstu skammtagjöf
		— innan 8 klst. frá skammtagjöf þegar vænta má mestu áhrifa	— einu sinni í viku eftir það	— einu sinni í fyrstu eða annarri viku skammtagjafar	— einu sinni í lok fyrsta mánaðar skammtagjafar
		— á 7. og 14. degi eftir skammtagjöf		— mánaðarlega eftir það	— á þriggja mánaða fresti eftir það
	Starfrænar prófanir	— fyrir fyrstu skammtagjöf — innan 8 klst. frá skammtagjöf þegar vænta má mestu áhrifa — á 7. og 14. degi eftir skammtagjöf	— fyrir fyrstu skammtagjöf — í fjórðu viku meðferðar eins nálægt lokum skammtatímabils (váhrifatímabils) og kostur er	— fyrir fyrstu skammtagjöf — einu sinni í fyrstu eða annarri viku skammtagjafar — mánaðarlega eftir það	— fyrir fyrstu skammtagjöf — einu sinni í lok fyrsta mánaðar skammtagjafar — á þriggja mánaða fresti eftir það

2. VIÐAUKI I

„C.21. ÖRVERUR Í JARÐVEGI: PRÓFUN Á UMMYNDUN KÖFNUNAREFNIS

1. AÐFERÐ

Þetta er sama aðferð og í OECD TG 216 (2000).

1.1 INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð er lýsing á rannsóknarstofuaðferð til rannsókna á því hvaða langtímaáhrif það getur haft á köfnunarefnisummyndun örvera í jarðvegi ef þær verða fyrir váhrifum af íðefni einu sinni. Prófunin byggist mestmegnis á leiðbeiningum Samtaka um plöntuvernd í Evrópu og Miðjarðarhafslöndunum (1. heimild). Einnig var tekið tillit til annarra leiðbeininga, þ.m.t. leiðbeininga frá Biologische Bundesanstalt í Þýskalandi (2. heimild), Umhverfisstofnun Bandaríkjanna (3. heimild), SETAC (4. heimild) og Alþjóðastaðlasamtökunum (ISO) (5. heimild). Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgirate á Ítalíu árið 1995 (6. heimild), var gerð samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hversu margar skyldi nota í þessari prófun. Ráðleggingar um töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna eru byggð á leiðbeiningaskjali ISO (7. heimild) og ráðleggingum frá vinnufundinum í Belgirate. Við mat og úttekt á eitureigineikum prófunarefnisins getur reynst nauðsynlegt að ákvarða áhrif á virkni örvera í jarðvegi, t.d. þegar þörf er á gögnum um hugsanlegar aukaverkanir plöntuvarnarefna á örflóru í jarðvegi eða þegar þess er vænst að örverur í jarðvegi verði fyrir váhrifum af öðrum íðefnum en plöntuvarnarefnum. Prófun á ummyndun köfnunarefnis er gerð til að ákvarða áhrif slíkra íðefna á örflóru í jarðvegi. Við prófun á íðefnum í landbúnaði (t.d. plöntuvarnarefnum, áburði, íðefnum í skógrækt) er rannsökuð bæði ummyndun köfnunarefnis og ummyndun kolefnis. Ef um önnur íðefni er að ræða nægir að prófa ummyndun köfnunarefnis. Ef slík íðefni eru prófuð með tilliti til ummyndunar köfnunarefnis, og EC₅₀-gildi eru á því bili sem þekkist fyrir nitrúnarlata sem fást á almennum markaði (t.d. nitrápýrín), má þó afla frekari upplýsinga með því að rannsaka ummyndun kolefnis.

Jarðvegur er gerður úr lífrænum og ólífrænum þáttum sem koma fyrir í flókinni og sundurleitri samsetningu. Örverur gegna mikilvægu hlutverki í niðurbroti og ummyndun lífræns efnis í frjósömum jarðvegi og margar tegundir hafa áhrif á ólíka þætti í frjósemi jarðvegsins. Langvarandi röskun á þessum lífefnafræðilegu ferlum gæti hugsanlega raskað hringrás næringarefna sem getur aftur breytt frjósemi jarðvegsins. Ummyndun á kolefni og köfnunarefni á sér stað í öllum frjósömum jarðvegi. Þótt örverusamfélögin, sem valda þessum ferlum, séu breytileg eftir jarðvegsgerðum eru ummyndunarferlin í meginatriðum ávallt hin sömu.

Tilgangurinn með aðferðinni, sem hér er lýst, er að greina skaðleg langtímaáhrif efnis á ummyndunarferli köfnunarefnis í yfirborðsjarðvegi þar sem skilyrði eru loftháð. Prófunaraðferðin nýtist einnig til að meta áhrif ýmissa efna á ummyndun kolefnis sem örflóra jarðvegsins veldur. Myndun nitrats á sér stað þegar efnatengi kolefnis og köfnunarefnis rofna. Ef nitrátframleiðsla er jafnmikil í jarðvegi sem fær meðferð og samanburðarjarðvegi er því mjög líklegt að helstu niðurbrotsferli kolefnis séu ósköðduð og starfandi. Ætíð, sem er valið fyrir prófunina (refasmáramjöl), hefur ákjósanlegt kolefnis-/köfnunarefnishlutfall (vanalega á bilinu 12/1 og 16/1). Þar með eru minni líkur á kolefnissvelli en ella meðan á prófun stendur og ef örverusamfélögin hafa skaddast af völdum íðefnis gætu þau náð sér innan 100 daga.

Prófanirnar, sem þessi aðferð byggist á, voru upphaflega hannaðar fyrir efni þar sem vitað er fyrir fram hversu mikið magn berst í jarðveginn. Þetta á t.d. við um plöntuvarnarefni þar sem vitað er hversu miklu hefur verið dreift á viðkomandi land. Þegar um er að ræða íðefni í landbúnaði nægir að prófa tvo skammta sem eru hæfilegir með tilliti til þess magns sem ráðgert er að nota. Prófa má íðefni í landbúnaði sem virk innihaldsefni eða sem samsettar vörur. Prófunin er þó ekki bundin við íðefni í landbúnaði. Með því að breyta bæði magni prófunarefnisins, sem er sett í jarðveginn, og því hvernig gögnin eru metin má einnig nota prófunina í tilvikum þar sem ekki er vitað hversu mikið magn íðefnis berst í jarðveginn. Þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði má því ákvarða áhrif mismunandi styrks á ummyndun köfnunarefnis. Gögnin úr prófununum eru notuð til að draga upp skammtasvörunarferil og reikna út EC_x-gildi þar sem x er skilgreint sem hundradshluti áhrifa.

1.2 SKILGREININGAR

Ummyndun köfnunarefnis: endanlegt niðurbrot af völdum örvera á lífrænu efni sem inniheldur köfnunarefni, sem á sér stað með ferlum ammoníaksmyndunar og nitrunar, yfir í samsvarandi, ólífræna lokaafurð, nítat.

EC_x (hrifstyrkur): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun köfnunarefnis yfir í nítat sem nemur x hundraðshlutum.

EC₅₀ (miðgildi hrifstyrks): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun köfnunarefnis yfir í nítat sem nemur 50 hundraðshlutum (50%).

1.3 VIÐMIÐUNAREFNI

Ekkert.

1.4 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Plöntumjöli í duftformi er bætt í sigtaðan jarðveg sem fær annaðhvort meðferð með prófunarefninu eða er látinn óhreyfður (til samanburðar). Ef iðefni í landbúnaði eru prófuð er mælt með a.m.k. tvenns konar prófunarstyrkleika sem velja skal með hliðsjón af mesta styrk sem gert er ráð fyrir á landinu. Eftir 0, 7, 14 og 28 daga ræktun (incubation) eru sýni úr jarðvegi sem fær meðferð, og samanburðarjarðvegi, dregin út með viðeigandi leysi og nítatmagnið í útdrættinum ákvarðað. Myndun nitrats í sýnunum, sem fá meðferð, er borin saman við myndunina í samanburðarsýnunum og hlutfallslegt frávik meðferðarsýna miðað við samanburðarsýni reiknað út. Allar prófanir skulu standa yfir í a.m.k. 28 daga. Ef munurinn milli meðferðarjarðvegs og samanburðarjarðvegs er 25% eða meiri á 28. degi er mælingum haldið áfram í allt að 100 daga. Við prófun á öðrum iðefnum en iðefnum í landbúnaði er prófunarefni af mismunandi styrk bætt í jarðvegssýnin og nítatmagn, sem myndast í meðferðarsýnum og samanburðarsýnum, mælt eftir 28 daga ræktun. Niðurstöður úr prófunum með margs konar styrk eru greindar og notað aðhvarfslíkan og EC_x-gildin reiknuð út (t.d. EC₅₀, EC₂₅ og/eða EC₁₀). Sjá skilgreiningar.

1.5 GILDI PRÓFUNARINNAR

Mat á niðurstöðum prófana á iðefnum í landbúnaði er byggt á tiltölulega litlum mun (t.d. meðalgildi ±25%) á styrk nitrats í samanburðar- og meðferðarsýnum úr jarðvegi. Munur af þessari stærðargráðu á samanburðarsýnum getur leitt til rangrar niðurstöðu. Munur á milli samhliða samanburðarsýna skal því vera minni en ±15%.

1.6 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1 Búnaður

Notuð eru prófunarílát úr hvarftregu efni. Þau skulu vera af hæfilegri stærð miðað við aðferðina sem er notuð við ræktun jarðvegsins, þ.e. ræktun í lausum jarðvegi eða sem röð stakra jarðvegssýna (sjá lið 1.7.1.2). Mikilvægt er að halda vatnstapi í lágmarki og sjá til þess að loftskipti geti átt sér stað meðan prófunin stendur yfir (t.d. má leggja gataða pólýetýlenfilmu yfir prófunarilátin). Ef rokgjörn efni eru prófuð skal nota lokað og loftþétt ílát. Þau skulu vera af þeirri stærð að jarðvegssýnið fylli upp í um það bil fjórðung af rúmmáli þeirra.

Notaður er venjulegur rannsóknarstofubúnaður, þ.m.t. eftirfarandi:

- hristari: vélhristari eða sambærilegur búnaður
- skilvinda (3 000 g) eða síunarbúnaður (með nítatfríum síupappír),
- tæki með nægilegan næmleika og samanburðarnákvæmni til greiningar á nitrati.

1.6.2 Val og fjöldi jarðvegsgerða

Aðeins ein gerð jarðvegs er notuð. Mælt er með jarðvegi með eftirfarandi eiginleikum:

- sandinnihald: ekki undir 50% og ekki yfir 75%,
- pH: 5,5 – 7,5,

— innihald lífræns kolefnis: 0,5 – 1,5%,

— mæla skal lífmassa örvera (8. og 9. heimild) og kolefnisinnihald hans skal vera a.m.k. 1% af samanlögðu, lífrænu kolefni jarðvegsins.

Í flestum tilvikum er jarðvegur með þessa eiginleika dæmi um verstu, hugsanlegu aðstæður þar eð ásig prófunarefnisins er í lágmarki en aðgengi þess fyrir örflórana að því er í hámarki. Þar af leiðandi er prófun með öðrum gerðum jarðvegs alla jafna ónaðsynleg. Í sumum tilvikum, t.d. þegar gert er ráð fyrir því að nota prófunarefnið aðallega í sérstökum jarðvegi, s.s. súrum skógarjarðvegi, eða þegar um er að ræða iðefni með rafstöðuhleðslu, getur þó verið nauðsynlegt að nota aðra jarðvegsgerð.

1.6.3 Taka og geymsla jarðvegssýna

1.6.3.1 Sýnataka

Nákvæmar upplýsingar eiga að vera tiltækar um sögu staðarins þar sem jarðvegurinn, sem prófa skal, er tekinn. Upplýsingarnar skulu varða nákvæma staðsetningu, gróðurþekju, dagsetningar á meðferð með plöntuvarnarefnum, lífrænum og ólífrænum áburði, viðbætur lífrænna efna eða mengun fyrir slysni. Velja skal stað fyrir jarðvegstöku sem unnt er að nota lengi. Land, sem er að staðaldri notað sem beitoland, og akrar undir einærum korntegundum (nema máis) eða þétt sáðum grænaburðarplöntum (green manures) henta vel. Sýnatökustaðurinn má ekki hafa fengið meðferð með plöntuvarnarefni í a.m.k. eitt ár áður en sýni eru tekin. Lífrænn áburður skal ekki heldur hafa verið borinn á í a.m.k. sex mánuði. Jarðefnaáburð má einungis nota þegar plönturnar hafa þörf fyrir hann og ekki skal taka jarðvegssýni fyrr en a.m.k. þrír mánuðir eru liðnir frá því að áburðurinn var borinn á. Forðast skal að nota jarðveg hafi verið borinn á hann áburður sem vitað er að hefur sæfandi áhrif (t.d. kalsíumsýanamíð).

Forðast skal að taka sýni á langvarandi tímabili (30 daga eða lengur) eða strax í kjölfar þess að ríkt hafa þurrkar eða þegar jarðvegurinn er vatnsósa. Þegar um er að ræða plægt land skulu sýni tekin á 0 til 20 cm dýpi. Á grasi vöxnu landi (beitolandi) eða öðru landi, sem er ekki plægt langtímum saman (a.m.k. eitt vaxtarskeið), getur hámarksdýpt sýnatöku verið lítið eitt meiri en 20 cm (t.d. 25 cm).

Jarðvegssýni skulu flutt í þannig ílátum og við þannig hitaskilyrði að tryggt sé að upphaflegir eiginleikar jarðvegsins breytist ekki umtalsvert.

1.6.3.2 Geymsla

Æskilegast er að nota nýtekin jarðvegssýni af viðkomandi stað. Ef ekki er hægt að komast hjá því að geyma sýnin á rannsóknarstofu má geyma þau í myrkri við 4 ± 2 °C í þrjá mánuði hið mesta. Tryggja verður loftháð skilyrði þar sem jarðvegurinn er í geymslu. Ef jarðvegur er tekinn af svæðum þar sem hann er frosinn í a.m.k. þrjá mánuði á ári kemur til greina að geyma hann í sex mánuði við –18 til –22 °C. Mæla skal lífmassa örvera jarðvegs í geymslu fyrir hverja tilraun og kolefnisinnihald lífmassans skal vera a.m.k. 1% af samanlögðu lífrænu kolefnisinnihaldi jarðvegsins (sjá lið 1.6.2).

1.6.4 Meðhöndlun og undirbúningur jarðvegs fyrir prófun

1.6.4.1 Forræktun

Ef jarðvegurinn hefur verið í geymslu (sjá lið 1.6.3.2) er mælt með forræktun í 2 til 28 daga. Í forræktuninni skal hita- og rakastig jarðvegsins vera svipað og í prófuninni (sjá liði 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

1.6.4.2 Eðlisefnafræðilegir eiginleikar

Stórir hlutir (steinar, plöntuhlutar o.s.frv.) eru handtíndir úr jarðveginum sem síðan er sigtaður rakur, án þess að hann þorni of mikið, að kornastærð sem er 2 mm eða minni. Jafna skal rakastig jarðvegssýnisins með eimuðu eða afjönuðu vatni að gildi sem liggur á bilinu 40 til 60% af mestu vatnsheldni.

1.6.4.3 *Auðgun með lífrænu æti*

Bæta skal jarðveginn með heppilegu, lífrænu hvarfefni, t.d. möluðum, grænum refasmára (aðalinnihaldsefni: refasmári (*Medicago sativa*)) með hlutfall C/N á bilinu 12/1 til 16/1. Æskilegt hlutfall refasmára og jarðvegs er 5 g af refasmára á hvert kíló jarðvegs (þurrvigt).

1.6.5 **Tilreiðsla prófunarefnis sem á að setja í jarðveg**

Prófunarefnið er alla jafna notað með burðarefni. Burðarefnið getur verið vatn (fyrir efni sem eru vatnsleysanleg) eða hvarftregt, fast efni, s.s. finn kvarssandur (kornastærð: 0,1 – 0,5 mm). Forðast skal fljótandi burðarefni, önnur en vatn (t.d. lífræn leysiefni, s.s. aseton eða klóróform) þar eð þau geta skaðað örflórana. Ef sandur er notaður sem burðarefni má húða hann með prófunarefninu, uppleystu eða í sviflausn, í viðeigandi leysiefni. Í slíkum tilvikum skal láta leysiefnið gufa upp áður en sandinum er blandað í jarðveginn. Svo að prófunarefnið dreifist sem best í jarðveginum er mælt með 10 g af sandi á hvert kíló af jarðvegi (þurrvigt). Samanburðarsýni eru einungis meðhöndluð með sama magni af vatni og/eða kvarssandi.

Þegar rokgjörn efni eru notuð skal forðast eins og framast er kostur að þau tapist í meðhöndluninni og reyna að tryggja að þau dreifist jafnt í jarðveginum (t.d. ætti að sprauta prófunarefninu í jarðveginn á mörgum stöðum).

1.6.6 **Prófunarstyrkur**

Við prófun á íðefnum í landbúnaði skal nota a.m.k. tvenns konar styrkleika. Minni styrkleikinn skal a.m.k. samsvara mesta magni sem búist er við að berist í jarðveginn við raunverulegar aðstæður en meiri styrkleikinn skal vera tiltekið margfeldi af minni styrkleikanum. Við útreikning á styrkleika prófunarefnis, sem er bætt við í jarðveg, er gengið út frá jafnri upptöku að 5 cm dýpi og að þéttleiki lausa jarðvegsins sé 1,5. Sé um að ræða íðefni í landbúnaði, sem eru sett beint í jarðveg, eða íðefni þar sem hægt er að segja fyrir um það magn sem berst í jarðveginn er mælt með því að prófunarstyrkurinn sé annars vegar mesti, áætlaði styrkur í umhverfinu (PEC) og hins vegar fimmfaldur sá styrkur. Efni, sem fyrirhugað er að setja í jarðveg nokkrum sinnum á einu tímabili, skulu prófuð við þann styrk sem fæst með því að margfalda áætlaðan styrk í umhverfinu með þeim fjölda skipta sem gert er ráð fyrir að nota efinn. Mesti styrkur, sem er prófaður, skal þó ekki vera meiri en tífaldur hámarksstyrkur sem er notaður í eitt skipti. Ef önnur íðefni en íðefni í landbúnaði eru prófuð er notuð jafnhlutfallaröð a.m.k. fimm styrkleika. Styrkleikarnir, sem eru prófaðir, skulu spanna það svið sem þarf til að ákvarða EC_x-gildin.

1.7 **FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR**

1.7.1 **Skilyrði við skammtagjöf prófunarefnis**

1.7.1.1 *Meðferð og samanburður*

Við prófun á íðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í þrjá jafnþunga hluta. Burðarefni ásamt prófunarefni er blandað í tvo hluta en í þriðja hlutann er blandað burðarefni án prófunarefnis (til samanburðar). Mælt er með a.m.k. þremur samhliða sýnum, bæði úr meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi. Við prófun á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í sex jafnþunga hluta. Burðarefni ásamt prófunarefni er blandað í fimm hluta en í sjötta hlutann er blandað burðarefni án íðefnis. Mælt er með þremur samhliða sýnum, bæði fyrir meðhöndlaða hluta og samanburð. Gæta skal þess að tryggja jafna dreifingu prófunarefnisins í jarðvegssýnum sem eru meðhöndluð. Forðast skal að jarðvegurinn þjappist eða að kekkir myndist við blöndun.

1.7.1.2 *Ræktun jarðvegssýna*

Ræktun jarðvegssýna getur farið fram á tvo vegu: sem sýni úr lausum jarðvegi fyrir hverja gerð jarðvegs, bæði meðhöndlaðan og ómeðhöndlaðan jarðveg, eða sem röð stakra og jafnstórra undirsýna úr hverri gerð jarðvegssýna, bæði meðhöndlaðra og ómeðhöndlaðra. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal þó aðeins nota röð stakra undirsýna. Þegar jarðvegur er ræktaður í lausu er mikið magn hvernar meðhöndlaðrar og ómeðhöndlaðrar gerðar af jarðvegi undirbúið og undirsýni tekin til greiningar eftir þörfum meðan á prófun stendur. Það magn sem er undirbúið fyrir hverja meðhöndlun og samanburð fer eftir stærð undirsýnanna, fjölda samhliða sýna, sem eru notuð til greiningar, og því hve oft gert er ráð fyrir að sýni verði tekin. Þegar jarðvegssýni eru ræktað í lausu skulu þau blönduð vandlega áður en undirsýni eru tekin. Þegar jarðvegurinn er ræktaður sem röð stakra jarðvegssýna er hverju meðhöndluðu eða ómeðhöndluðu jarðvegssýni í lausu skipt niður í þann fjölda undirsýna sem nauðsynlegur er og þau notuð eftir þörfum.

Í tilraunum þar sem gera má ráð fyrir því að sýni verði tekin oftari en tvisvar þarf að undirbúa svo mörg undirsýni að nægi fyrir öll samhliða sýni og öll sýnatökutíðvik. Setja skal a.m.k. þrjú samhliða sýni úr prófunarjarðveginum í ræktun við loftháð skilyrði (sjá lið 1.7.1.1). Í öllum prófunum skal nota viðeigandi ílát með nægilegu kollrúmi til að komast hjá því að loftfirrð skilyrði skapist. Þegar roksgjörn efni eru prófuð skal aðeins nota röð stakra undirsýna.

1.7.1.3 *Prófunarskilyrði og lengd prófunar*

Prófunin er framkvæmd í myrkri við herbergishita, 20 ± 2 °C. Meðan á prófun stendur skal rakainnihald jarðvegssýnanna haldast milli 40 og 60% af mestu vatnsheldni jarðvegsins (sjá lið 1.6.4.2); leyfilegt frávik er $\pm 5\%$. Bæta má við eimuðu, afjönuðu vatni eftir þörfum.

Prófunin skal eigi standa skemur yfir en í 28 daga. Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð er borið saman hlutfall níttratmyndunar í meðhöndluðum sýnum og samanburðarsýnum. Ef munurinn er meiri en 25% á 28. degi er prófuninni haldið áfram þar til munurinn er orðinn 25% eða minni eða í 100 daga að hámarki, eftir því hvort næst fyrr. Þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði er prófun hætt eftir 28 daga. Á 28. degi er níttratmagn í meðhöndluðum jarðvegssýnum og samanburðarsýnum ákvarðað og EC_x-gildin reiknuð.

1.7.2 **Sýnataka og greining jarðvegs**

1.7.2.1 *Áætlun fyrir töku jarðvegssýna*

Við prófun íðefna í landbúnaði er nítратinnihald jarðvegssýna greint á dögum 0, 7, 14 og 28. Ef framlengja þarf prófunina skulu frekari mælingar gerðar með 14 daga millibili eftir 28. daginn.

Við prófun annarra íðefna en íðefna í landbúnaði eru prófuð jarðvegssýni með a.m.k. fimm mismunandi styrkleikum og nítратinnihald þeirra ákvarðað í upphafi (dagur 0) og við lok váhrifatímabils (dagur 28). Bæta má við ákvörðun þar á milli, t.d. á 7. degi ef það er talið nauðsynlegt. Niðurstöðurnar, sem fást á 28. degi, eru notaðar til að ákvarða EC_x-gildi íðefnisins. Ef þurfa þykir má nota gögn úr samanburðarsýnum frá degi 0 til að finna upphaflegt magn nítrats í jarðveginum.

1.7.2.2 *Greining jarðvegssýna*

Það magn nítrats, sem hefur myndast í hverju meðhöndluðu sýni og samhliða samanburðarsýni, er ákvarðað í hvert skipti sem sýni eru tekin. Nítрат er dregið úr jarðveginum með því að hrista sýnin með heppilegu útdráttarleysiefni, t.d. 0,1 M kalíumklóríðlausn. Mælt er með hlutfallinu 5 ml af kalíumklóríðlausn á hvert gramm jarðvegs (þurrvigti). Til að ná hámarksútdrætti skulu ílátin, sem jarðvegurinn og útdráttarleysiefnið eru höfð í, ekki vera meira en hálf full. Blöndurnar eru hristar í 60 mínútur við 150 snúninga á mínútu. Blöndurnar eru skildar í skilvindu eða siaðar og nítратinnihald vökvasanna mælt. Hægt er að geyma agnafrían vökvaútdrátt við -20 ± 5 °C í allt að sex mánuði áður en hann er efnagreindur.

2. **GÖGN**

2.1 **ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA**

Ef prófanir eru gerðar með íðefnum úr landbúnaði skal það níttratmagn sem hefur myndast í hverju samhliða jarðvegssýni skráð og meðalgildi fyrir öll samhliða sýni sett fram í töfluformi. Meta skal ummyndunarhraða köfnunarefnis með viðeigandi og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum (t.d. F-prófun, 5% marktækni). Það níttratmagn sem myndast er gefið upp sem mg nítrats á kg af þurrum jarðvegi á dag. Hlutfall nítrats, sem myndast í sýnunum við hverja meðhöndlun, er borið saman við hlutfallið í samanburðarsýnunum og frávikíð frá samanburðarsýnum reiknað í hundradshlutum.

Ef prófanir eru gerðar með öðrum íðefnum en íðefnum úr landbúnaði skal níttratmagnið, sem myndast í hverju samhliða sýni, ákvarðað og ferill fyrir tengsl skammtastærðar og svörunar dreginn upp til að ákvarða EC_x-gildin. Níttratmagnið í meðhöndluðum sýnum (þ.e. mg nítrats á kg af þurrum jarðvegi) eftir 28 daga er borið saman við magnið í samanburðarsýnunum. Þessi gögn eru notuð til að reikna út hömlunargildi í hundradshlutum fyrir hvern prófunarstyrk.

Þessir hundraðshlutar eru settir fram á línuriti á móti styrk og síðan er notuð tölfraðileg aðferð til að reikna út EC_x -gildin Öryggismörk ($p = 0,95$) fyrir reiknuðu EC_x -gildin eru einnig ákvörðuð með stöðluðum aðferðum (10., 11. og 12. heimild).

Ef prófunarefni innihalda mikið magn köfnunarefnis getur það haft áhrif á það hve mikið níturat myndast meðan prófunin stendur. Ef þessi efni eru prófuð við mikinn styrk (t.d. með íðefnum sem ætlunin er að nota endurtekið) verður að setja upp viðeigandi samanburð í prófuninni (t.d. jarðveg með prófunarefni en án plöntumjòls). Taka verður tillit til gagna úr þessum samanburðarsýnum við útreikning á EC_x -gildum.

2.2 TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Þegar niðurstöður úr prófunum á íðefnum úr landbúnaði eru metnar og munurinn á hlutfalli nitrats, sem myndast annars vegar við minnsta styrkleika (þ.e. áætlaðan hámarksstyrk) og hins vegar í samanburðarsýninu, er jafn eða minni en 25% við hverja sýnatöku eftir 28. dag má líta svo á að efnið hafi engin langtímaáhrif á ummyndun köfnunarefnis í jarðvegi. Við mat á niðurstöðum úr prófunum á öðrum íðefnum en íðefnum úr landbúnaði eru gildin fyrir EC_{50} , EC_{25} og/eða EC_{10} notuð.

3. SKÝRSLUGJÖF

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Fullkomnar upplýsingar um þau jarðvegssýni, sem eru notuð, þ.m.t.:

- landtilvísun fyrir staðinn (breiddar- og lengdargráða),
- upplýsingar um sögu staðarins (þ.e. gróðurþekja, meðferð með plöntuvarnarefnum, áburðargjöf, mengun fyrir slysi o.s.frv.),
- uppruni (t.d. úr jarðvegi, sem er notaður til landbúnaðar, úr skógi o.s.frv.),
- dýpt þar sem sýnin eru tekin (cm),
- innihald sands, silts og leirs (% þurrvig),
- pH (í vatni),
- innihald lífræns kolefnis (% þurrvig),
- innihald köfnunarefnis (% þurrvig),
- upphaflegur styrkur nitrats (mg níturat/kg, þurrvig),
- plúsjónaskiptageta (mmól/kg),
- lífmassi örvera, gefinn upp sem hundraðshluti af heildarmagni lífræns kolefnis,
- tilvísun til aðferða sem eru notaðar við ákvörðun á hverri færribreytu,
- allar upplýsingar um töku og geymslu jarðvegssýna,
- nákvæmar upplýsingar um forræktun jarðvegs, ef um hana er að ræða.

Prófunarefni:

- eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- gögn til efnafræðilegrar sanngreiningar, þ.m.t. (ef við á): byggingarformúla, hreinleiki (þ.e. hundraðshluti virks efnis ef um plöntuvarnarefni er að ræða) og köfnunarefnisinnihald.

Æti:

- uppruni ætis,
- samsetning (t.d. refasmáramjöl, grænt refasmáramjöl),
- innihald kolefnis og köfnunarefnis (% þurrvigt),
- möskvastærð sigtis (mm).

Prófunarskilyrði:

- nákvæmar upplýsingar um auðgun jarðvegs með lífrænu æti,
- fjöldi styrkleika prófunarefnis sem er notað og, ef við á, rökstuðningur fyrir því hvaða styrkleikar eru valdir,
- nákvæmar upplýsingar um ísetningu prófunarefnis í jarðveginn,
- ræktunarhiti,
- rakastig jarðvegsins við upphaf prófunar og meðan á henni stendur,
- aðferð sem er notuð við ræktun jarðvegsins (t.d. í lausu eða sem röð stakra undirsýna),
- fjöldi samhliða sýna,
- sýnatökutímar,
- aðferð sem er notuð til að draga níturat úr jarðvegi.

Niðurstöður:

- greiningaraðferð og búnaður sem er notaður til að mæla níturat,
- töflusetning gagna, þ.m.t. stök gildi og meðalgildi fyrir nítratmælingar,
- mismunur á samhliða sýnum, annars vegar meðhöndluðum sýnum og hins vegar samanburðarsýnum,
- útskýringar á leiðréttingum í útreikningum, ef við á,
- munur á hlutfalli níttratmyndunar í hundradshlutum á hverjum sýnatökutíma eða, ef við á, gildið fyrir EC₅₀ með 95% öryggismörkum, önnur EC_x-gildi (t.d. EC₂₅ eða EC₁₀) með öryggisbili, svo og ferill á línuriti sem sýnir tengsl skammtastærðar og svörunar,
- töluleg úrvinnsla niðurstaðna,
- allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna.

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. 7. kafli: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. útg., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. september, 1987.
- 4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, ritstj. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

- 5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.
- 6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Ítalíu, 18. – 20. janúar 1995.
- 7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – 1. hluti: Substrate-induced respiration method.
- 9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – 2. hluti: Fumigation-extraction method.
- 10) Litchfield, J.T. og Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99–113.
- 11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3. útg., Cambridge, London og New-York.
- 12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

C.22. ÖRVERUR Í JARÐVEGI: PRÓFUN Á UMMYNDUN KOLEFNIS**1. AÐFERÐ**

Þetta er sama aðferð og í OECD TG 217 (2000).

1.1 INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð er lýsing á rannsóknarstofuaðferð til rannsókna á því hvaða langtímaáhrif það getur haft á kolefnisummyndun örvera í jarðvegi ef þær verða fyrir váhrifum af plöntuvarnarefni og hugsanlega öðrum íðefnum einu sinni. Prófunin byggist mestmegnis á leiðbeiningum Samtaka um plöntuvernd í Evrópu og Miðjarðarhafslöndunum (1. heimild). Einnig var tekið tillit til annarra leiðbeininga, þ.m.t. leiðbeininga frá Biologische Bundesanstalt í Þýskalandi (2. heimild), Umhverfisstofnun Bandaríkjanna (3. heimild) og SETAC (4. heimild). Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgíu á Ítalíu árið 1995 (5. heimild), var gerð samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hve margar skyldi nota í þessari prófun. Ráðleggingar um töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna eru byggð á leiðbeiningaskjali ISO (6. heimild) og ráðleggingum frá vinnufundinum í Belgíu.

Við mat og úttekt á eitureigineikum prófunarefnisins getur reynst nauðsynlegt að ákvarða áhrif á virkni örvera í jarðvegi, t.d. þegar þörf er á gögnum um hugsanlegar aukaverkanir plöntuvarnarefna á örflöru í jarðvegi eða þegar þess er vænst að örverur í jarðvegi verði fyrir váhrifum að öðrum íðefnum en plöntuvarnarefnum. Prófun á ummyndun kolefnis er gerð til að ákvarða áhrif slíkra íðefna á örflöru í jarðvegi. Við prófun á íðefnum í landbúnaði (t.d. plöntuvarnarefnum, áburði, íðefnum í skógrækt) er prófuð bæði ummyndun köfnunarefnis og ummyndun kolefnis. Ef um önnur íðefni er að ræða nægir að prófa ummyndun köfnunarefnis. Ef slík íðefni eru prófuð með tilliti til ummyndunar köfnunarefnis, og EC₅₀-gildi eru á því bili sem þekktist fyrir nítrunarlata sem fást á almennum markaði (t.d. nítrapýrin), má þó afla frekari upplýsinga með því að rannsaka ummyndun kolefnis.

Jarðvegur er gerður úr lífrænum og ólífrænum þáttum sem koma fyrir í flókninni og sundurleitri samsetningu. Örverur gegna mikilvægu hlutverki í niðurbroti og ummyndun lífræns efnis í frjósömum jarðvegi og margar tegundir hafa áhrif á ólíka þætti í frjósemi jarðvegsins. Langvarandi röskun á þessum lífnafræðilegu ferlum gæti hugsanlega raskað hringrás næringarefna sem getur aftur breytt frjósemi jarðvegsins. Ummyndun á kolefni og köfnunarefni á sér stað í öllum frjósömum jarðvegi. Þótt örverusamfélögin, sem valda þessum ferlum, séu breytileg eftir jarðvegsgerðum eru ummyndunarferlin í meginatriðum ávallt hin sömu.

Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að greina skaðleg langtímaáhrif efnis á ummyndunarferli köfnunarefnis í yfirborðsjarðvegi þar sem skilyrði eru loftháð. Prófunin er næm fyrir breytingum á stærð og starfsemi örverusamfélaganna sem valda ummyndun kolefnis sakir þess að í prófuninni eru þau bæði undir efnafraðilegu álagi og búa við kolefnissveldi. Notaður er sendinn jarðvegur sem inniheldur lítið af lífrænu efni. Jarðvegurinn er meðhöndlaður með prófunarefninu og er ræktaður við skilyrði sem eru þannig að efnaskipti örveranna geta orðið hröð. Við þau skilyrði gengur það kolefnissinnihald jarðvegsins, sem er auðveldlega aðgengilegt, fljótt til þurrðar. Þetta veldur kolefnissveldi sem bæði drepur frumur örvera og leiðir til dvala og/eða grómyndunar. Ef prófunin stendur yfir lengur en í 28 daga má fylgjast með þessum efnahvörfum í samanburðarsýnunum (ómeðhöndlaður jarðvegur) sem koma fram sem stigvaxandi tap örverulífsmassa með virkum efnaskiptum (7. heimild). Ef lífmassi jarðvegs, þar sem kolefnissveldi ríkir, verður fyrir áhrifum frá íðefnum við prófunarskilyrði getur hugsast að hann nái ekki aftur því ástandi sem er í samanburðarsýninu. Röskun, sem prófunarefnið veldur einhvern tíma í prófuninni, helst því oft fram til loka prófunarinnar.

Prófarnir, sem þessi aðferð byggist á, voru upphaflega hannaðar fyrir efni þar sem vitað er fyrir fram hversu mikið magn berst í jarðveginn. Þetta á t.d. við um plöntuvarnarefni þar sem vitað er hversu miklu hefur verið dreift á viðkomandi land. Þegar um er að ræða íðefni í landbúnaði nægir að prófa tvo skammta sem eru hæfilegir með tilliti til þess magns sem ráðgert er að nota. Prófa má íðefni í landbúnaði sem virk innihaldsefni eða sem samsettar vörur. Prófunin er þó ekki bundin við íðefni með áætlaðan styrk í umhverfinu. Með því að breyta bæði magni prófunarefnisins, sem er sett í jarðveginn, og því hvernig gögnin eru metin má einnig nota prófunina í tilvikum þar sem ekki er vitað hversu mikið magn íðefnis berst í jarðveginn. Þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði má því ákvarða áhrif mismunandi styrks á ummyndun kolefnis. Gögnin úr þessum prófunum eru notuð til að draga upp feril sem sýnir tengsl skammtastærðar og svörunar og reikna út EC_x-gildi þar sem x er skilgreint sem hundraðshluti áhrifa.

1.2 SKILGREININGAR

Ummyndun kolefnis: niðurbrot lífræns efnis af völdum örvera þar sem ólífræn lokaafurð, koltvísýringur, myndast.

EC_x (hrifstyrkur): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun kolefnis yfir í koltvísýring sem nemur x hundraðshlutum.

EC₅₀ (miðgildi hrifstyrks): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun kolefnis yfir í koltvísýring sem nemur 50 hundraðshlutum.

1.3 VIÐMIÐUNAREFNI

Ekkert.

1.4 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Sigtaður jarðvegur er annaðhvort meðhöndlaður með prófunarefninu eða ekki meðhöndlaður (til samanburðar). Ef iðefni í landbúnaði eru prófuð er mælt með a.m.k. tvenns konar prófunarstyrkleika sem velja skal með hliðsjón af mesta styrk sem gert er ráð fyrir á landinu. Eftir 0, 7, 14 og 28 daga ræktun er glúkósa blandað saman við meðhöndluð sýni úr jarðvegi og samanburðarsýni og glúkósaörvuð öndun er mæld í 12 klst. samfleytt. Öndunin er gefin upp sem magn koltvísýringslosunar (mg koltvísýringur á kg af þurrum jarðvegi á klst.) eða sem súrefnisupptaka (mg súrefnis á kg af jarðvegi á klst.). Meðalöndunin er borin saman í meðhöndluðu jarðvegssýnunum og samanburðarsýnunum og hlutfallslegt frávik reiknað út þar á milli. Allar prófanir skulu standa yfir í a.m.k. 28 daga. Ef munurinn á meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi er 25% eða meiri á 28. degi er mælingum haldið áfram með 14 daga millibili í allt að 100 daga. Við prófun á öðrum iðefnum en iðefnum í landbúnaði er prófunarefni af mismunandi styrk bætt í jarðvegssýnin og öndunin örvuð með glúkósa, (þ.e. meðaltal koltvísýrings sem myndast eða meðalsúrefnisupptaka) er mæld eftir 28 daga. Niðurstöður úr prófunum með röð mismunandi styrkleika eru greindar með aðhvarfslíkani og EC_x-gildin reiknuð út (þ.e. EC₅₀, EC₂₅ og/eða EC₁₀). Sjá skilgreiningar.

1.5 GILDI PRÓFUNARINNAR

Mat á niðurstöðum prófana á iðefnum í landbúnaði er byggt á tiltölulega litlum mun (t.d. meðalgildi ±25%) á milli koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í (eða úr) samanburðarsýnum og meðhöndluðum sýnum jarðvegs og því geta mikil frávik í samanburðarsýnunum leitt til rangrar niðurstöðu. Munur milli samhliða samanburðarsýna skal því vera minni en ±15%.

1.6 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1 Búnaður

Notuð eru prófunarílát úr hvarftregu efni þau skulu vera af hæfilegri stærð miðað við aðferðina sem er notuð við ræktun jarðvegsins, þ.e. ræktun í lausum jarðvegi eða sem röð stakra jarðvegssýna (sjá lið 1.7.1.2). Mikilvægt er að halda vatnstapi í lágmarki og sjá til þess að loftskipti geti átt sér stað meðan prófunin stendur yfir (t.d. má leggja gataða pólýetýlenfilmu yfir prófunarílatin). Ef roksgjörn efni eru prófuð skal nota lokað og loftþétt ílát. Þau skulu vera af þeirri stærð að jarðvegssýnið fylli upp í um það bil fjórðung af rúmmáli þeirra.

Við ákvörðun á glúkósaörvaðri öndun er nauðsynlegt að hafa ræktunarkerfi og tækjabúnað til að mæla koltvísýringsframleiðslu eða súrefnisupptöku. Dæmi um slík kerfi og tækjabúnað má finna í 8., 9., 10. og 11. heimild.

1.6.2 Val á jarðvegsgerðum og fjöldi þeirra

Aðeins er notuð ein gerð jarðvegs. Mælt er með jarðvegi með eftirfarandi eiginleikum:

— sandinnihald: ekki undir 50% og ekki yfir 75%,

— pH: 5,5 – 7,5,

- innihald lífræns kolefnis: 0,5 – 1,5%,
- mæla skal lífmassa örvera (12. og 13. heimild) og kolefnisinnihald hans skal vera a.m.k. 1% af samanlögðu, lífrænu kolefni jarðvegsins.

Í flestum tilvikum er jarðvegur með þessa eiginleika dæmi um verstu, hugsanlegu aðstæður þar eð ásig prófunarefnisins er í lágmarki en aðgengi þess fyrir örflórana að því er í hámarki. Þar af leiðandi er prófun með öðrum gerðum jarðvegs alla jafna ónaðsynleg. Í sumum tilvikum, t.d. þegar gert er ráð fyrir því að nota prófunarefnið aðallega í sérstökum jarðvegi, s.s.súrum skógarjarðvegi, eða þegar um er að ræða íðefni með rafstöðuhleðslu, getur þó verið nauðsynlegt að nota aðra jarðvegsgerð.

1.6.3 Taka og geymsla jarðvegssýna

1.6.3.1 *Sýnataka*

Nákvæmar upplýsingar eiga að vera tiltækar um sögu staðarins þar sem prófunarjarðvegurinn er tekinn. Upplýsingarnar skulu varða nákvæma staðsetningu, gróðurþekju, dagsetningar þegar plöntuvarnarefni eru notuð, þegar lífrænn eða ólífrænn áburður er notaður, viðbætur lífrænna efna eða mengun fyrir slysi. Velja skal stað fyrir jarðvegstöku sem unnt er að nota lengi. Land, sem er að staðaldri notað sem beutiland, og akrar undir einærum korntegundum (nema mais) eða þétt sáðum grænaburði henta vel. Sýnatökustaðurinn má ekki hafa fengið meðferð með plöntuvarnarefni í a.m.k. eitt ár áður en sýni eru tekin. Lífrænn áburður skal ekki heldur hafa verið borinn á í a.m.k. sex mánuði. Jarðefnaáburð má einungis nota þegar plönturnar hafa þörf fyrir hann og ekki skal taka jarðvegssýni fyrir en a.m.k. þrír mánuðir eru liðnir frá því að áburðurinn var borinn á. Forðast skal að nota jarðveg hafi verið borinn á hann áburður sem vitað er að hefur sæfandi áhrif (t.d. kalsíumsýanamíð).

Forðast skal að taka sýni á langvarandi tímabili (30 daga eða lengur) eða strax í kjölfar þess að ríkt hafa þurrkar eða þegar jarðvegurinn er vatnsósa. Þegar um er að ræða plægt land skulu sýni tekin á 0 til 20 cm dýpi. Á grasi vöxnu landi (beutilandi) eða öðru landi, sem er ekki plægt langtímum saman (a.m.k. eitt vaxtarskeið), getur hámarksdýpt sýnatöku verið lítið eitt meiri en 20 cm (t.d. 25 cm). Jarðvegssýni skulu flutt í þannig ílátum og við þannig hitaskilyrði að tryggt sé að upphaflegir eiginleikar jarðvegsins breytist ekki umtalsvert.

1.6.3.2 *Geymsla*

Æskilegast er að nota nýtekin jarðvegssýni af viðkomandi stað. Ef ekki er hægt að komast hjá því að geyma sýnin á rannsóknarstofu má geyma þau í myrkri við 4 ± 2 °C í þrjá mánuði hið mesta. Tryggja verður loftháð skilyrði þar sem jarðvegurinn er í geymslu. Ef jarðvegur er tekinn af svæðum þar sem hann er frosinn í a.m.k. þrjá mánuði á ári kemur til greina að geyma hann í sex mánuði við -18 °C. Mæla skal lífmassa örvera jarðvegs í geymslu fyrir hverja tilraun og kolefnisinnihald lífmassans skal vera a.m.k. 1% af samanlögðu, lífrænu kolefnisinnihaldi jarðvegsins (sjá lið 1.6.2).

1.6.4 Meðhöndlun og tilreiðsla jarðvegs fyrir prófun

1.6.4.1 *Forrækt*

Ef jarðvegurinn hefur verið í geymslu (sjá lið 1.6.4.2 og 1.7.1.3) er mælt með forræktun í 2 til 28 daga. Í forræktuninni skal hita- og rakastig jarðvegsins vera svipað og í prófuninni (sjá liði 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Eðlisefnafræðilegir eiginleikar*

Stórir hlutir (steinar, plöntuhlutar o.s.frv.) eru handtíndir úr jarðveginum sem síðan er sigtaður rakur, án þess að hann þorni of mikið, að kornastærð sem er 2 mm eða minni. Jafna skal rakastig jarðvegssýnisins með eimuðu eða afjönuðu vatni að gildi sem liggur á bilinu 40 til 60% af mestu vatnsheldni.

1.6.5 Tilreiðsla prófunarefnis sem á að setja í jarðveg

Prófunarefnið er alla jafna notað með burðarefni. Burðarefnið getur verið vatn (fyrir efni sem eru vatnsleysanleg) eða hvarftregt, fast efni, s.s. finn kvarssandur (kornastærð: 0,1 -0,5 mm). Forðast skal fljóttandi burðarefni, önnur en vatn (t.d. lífræn leysiefni s.s. aseton eða klóróform) þar eð þau geta skaðað örflórana.

Ef sandur er notaður sem burðarefni má húða hann með prófunarefninu, uppleystu eða í svíflausn, í viðeigandi leysiefni. Í slíkum tilvikum skal láta leysiefnið gufa upp áður en sandinum er blandað í jarðvegin. Svo að prófunarefnið dreifist sem best í jarðveginum er mælt með 10 g af sandi á hvert kíló af jarðvegi (þurrvigti). Samanburðarsýni eru einungis meðhöndluð með sama magni af vatni og/ eða kvarssandi.

Þegar rokgjörn efni eru notuð skal forðast að þau tapist í meðhöndluninni og reyna að tryggja að þau dreifist jafnt í jarðveginum (t.d. ætti að sprauta prófunarefninu í jarðvegin á mörgum stöðum).

1.6.6 **Prófunarstyrkur**

Við prófun á plöntuvarnarefnum eða öðrum iðefnum með áætluðum styrk í umhverfinu skal nota a.m.k. tvenns konar styrkleika. Minni styrkleiki skal a.m.k. samsvara mesta magni sem búið er við að ná til jarðvegsins við raunverulegar aðstæður en meiri styrkleiki skal vera margfeldi af minni styrkleikanum. Við útreikning á styrkleika prófunarefnis sem er sett í jarðveg er gengið út frá jafnri upptöku að 5 cm dýpi og að þéttleiki lausa jarðvegsins sé 1.5. Sé um að ræða iðefni í landbúnaði, sem eru sett beint í jarðveg, eða iðefni þar sem hægt er að segja fyrir um það magn sem kemst í jarðvegin er mælt með því að prófunarstyrkurinn sé annars vegar áætlaður styrkur í umhverfinu (PEC) og hins vegar fimmfaldur sá styrkur. Efni, sem fyrirhugað er að setja í jarðveg nokkrum sinnum á einu tímabili, skulu prófuð með styrk sem er fenginn með því að margfalda áætlaðan styrk í umhverfinu með þeim fjölda ísetninga sem gert er ráð fyrir. Efni mörk styrks, sem er prófaður, skulu þó ekki fara yfir tífaldan hámarksstyrk við eina ísetningu.

Ef önnur iðefni en iðefni í landbúnaði eru prófuð er notuð jafnhlutfallaröð a.m.k. fimm styrkleika. Styrkleikarnir, sem eru prófaðir, skulu spanna það svið sem þarf til að ákvarða EC_x-gildin.

1.7 **FRAMKVÆMD PRÓFUNAR**

1.7.1 **Váhrifaskilyrði**

1.7.1.1 *Meðhöndlun og samanburður*

Við prófun á iðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í þrjá jafnþunga hluta. Burðarefni ásamt prófunarefni er blandað í tvo hluta en í þriðja hlutann er blandað burðarefni án prófunarefnis (til samanburðar). Mælt er með a.m.k. þremur samhlíða sýnum, bæði úr meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi. Við prófun á öðrum iðefnum en iðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í sex jafnþunga hluta. Burðarefni ásamt prófunarefni er blandað í fimm hluta en í sjötta hlutann er blandað burðarefni án iðefnis. Mælt er með þremur hliðstæðum sýnum, bæði fyrir meðhöndluð sýni og samanburðarsýni. Gæta skal þess að tryggja jafna dreifingu prófunarefnisins í jarðvegssýnum sem eru meðhöndluð. Forðast skal að jarðvegurinn þjappist eða að kekkir myndist við blöndun.

1.7.1.2 *Ræktun jarðvegssýna*

Ræktun jarðvegssýna getur farið fram á tvo vegu: sem sýni úr lausum jarðvegi fyrir hverja gerð jarðvegs, bæði meðhöndlaðan og ómeðhöndlaðan jarðveg, eða sem röð stakra og jafnstórra undirsýna úr hverri gerð jarðvegssýna, bæði meðhöndlaðra og ómeðhöndlaðra. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal þó aðeins nota röð stakra undirsýna. Þegar jarðvegur er ræktaður í lausu er mikið magn hvernar meðhöndlaðrar og ómeðhöndlaðrar gerðar af jarðvegi undirbúið og undirsýni tekin til greiningar eftir þörfum meðan á prófun stendur. Það magn sem er undirbúið fyrir hverja meðhöndlun og samanburð fer eftir stærð undirsýnanna, fjölda samhlíða sýna, sem eru notuð til greiningar, og því hve oft gert er ráð fyrir að sýni verði tekin. Þegar jarðvegssýni eru rækтуð í lausu skulu þau blönduð vandlega áður en undirsýni eru tekin. Þegar jarðvegurinn er ræktaður sem röð stakra jarðvegssýna er hverju meðhöndluðu eða ómeðhöndluðu jarðvegssýni í lausu skipt niður í þann fjölda undirsýna sem nauðsynlegur er og þau notuð eftir þörfum. Í tilraunum þar sem gera má ráð fyrir því að sýni verði tekin oftar en tvisvar þarf að undirbúa svo mörg undirsýni að nægi fyrir öll samhlíða sýni og öll sýnatökutílvik. Setja skal a.m.k. þrjú samhlíða sýni úr prófunarjarðveginum í ræktun við loftháð skilyrði (sjá lið 1.7.1.1). Í öllum prófunum skal nota viðeigandi ílát með nægilegu kollrúmi til að komast hjá því að loftfirrð skilyrði skapist. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal aðeins nota röð einstakra undirsýna.

1.7.1.3 *Prófunarskilyrði og lengd prófunar*

Prófunin er framkvæmd í myrkri við herbergishita, 20 ± 2 °C. Meðan á prófun stendur skal rakainnihald jarðvegssýnanna haldast milli 40 og 60% af mestu vatnsheldni jarðvegsins (sjá lið 1.6.4.2); leyfilegt frávik er $\pm 5\%$. Bæta má við eimuðu, afjónuðu vatni eftir þörfum.

Prófunin skal standa yfir í 28 daga að lágmarki. Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð er borið saman magn koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í meðhöndluðum sýnum og samanburðarsýnum. Ef munurinn er meiri en 25% á 28. degi er prófuninni haldið áfram þar til munurinn er orðinn 25% eða minni eða í 100 daga að hámarki, eftir því hvort næst fyrr. Við prófun á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði er prófun hætt eftir 28 daga. Á 28. degi er magn losaðs koltvísýrings eða súrefnisupptöku í meðhöndluðum jarðvegssýnum og samanburðarsýnum ákvarðað og EC_x -gildi reiknuð.

1.7.2 **Sýnataka og greining jarðvegs**

1.7.2.1 *Áætlun fyrir töku jarðvegssýna*

Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð eru jarðvegssýni greind með tilliti til glúkósaörvaðrar öndunar á dögum 0, 7, 14 og 28. Ef framlengja þarf prófunina skulu frekari mælingar gerðar með 14 daga millibili eftir 28. daginn.

Við prófun annarra íðefna en íðefna í landbúnaði eru notaðir a.m.k. fimm mismunandi styrkleikar og glúkósaörvuð öndun ákvörðuð í þeim í upphafi (dagur 0) og við lok váhrifatímabilsins (dagur 28). Bæta má við ákvörðun þar á milli, t.d. á 7. degi ef það er talið nauðsynlegt. Niðurstöðurnar, sem fást á 28. degi, eru notaðar til að ákvarða EC_x -gildi íðefnisins. Ef það er talið æskilegt er hægt að nota gögn úr samanburðarsýnum frá degi 0 til að áætla upphaflegt magn lífmassa jarðvegsörvera með virkum efnaskiptum (12. heimild).

1.7.2.2 *Mæling á loftskiptum, sem eru örvuð með glúkósa*

Glúkósaörvuð öndun er ákvörðuð í hverju samhliða, meðhöndluðu sýni og samanburðarsýni í hvert skipti sem sýni eru tekin. Jarðvegssýnin eru blönduð með svo miklu magni af glúkósa að samstundis komi fram hámarkssvörun í öndun. Unnt er að ákvarða það magn glúkósa sem þarf til að kalla fram hámarkssvörun í tilteknum jarðvegi með forprófun þar sem notuð er röð mismunandi styrkleika af glúkósa (14. heimild). Þegar um er að ræða sendinn jarðveg með 0,5 – 1,5% lífrænu kolefni nægir þó venjulega að nota 2 000 mg til 4 000 mg glúkósa fyrir hvert kg af þurru jarðvegi. Glúkósann má mala í duft með hreinum kvarssandi (10 g sandur á kg af þurru jarðvegi) og blanda honum síðan jafnt við jarðveginn.

Jarðvegssýnin með glúkósanum eru höfð við hitastigið 20 ± 2 °C í hentugum tækjabúnaði til að mæla öndunina, annaðhvort stöðugt, á klukkutíma fresti eða á tveggja tíma fresti (sjá lið 1.6.1). Koltvísýringslosunin eða súrefnisupptakan er mæld í 12 klukkustundir samfleytt og mælingar skulu hefjast svo fljótt sem unnt er, þ.e. innan einnar eða tveggja klukkustunda frá því að glúkósanum er bætt í jarðveginn. Heildarmagn koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í 12 klukkustundir er mælt og meðalöndunin ákvörðuð.

2. **GÖGN**

2.1 **ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA**

Ef prófanir eru gerðar með íðefnum úr landbúnaði skal koltvísýringslosun eða súrefnisupptaka í hverju hliðstæðu jarðvegssýni skráð og meðalgildi allra hliðstæðra sýna sett fram í töfluformi. Meta skal niðurstöðurnar með viðeigandi og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum (t.d. F-prófun, 5% marktækni). Glúkósaörvuð öndun er gefin upp í mg koltvísýrings á kg af þurru jarðvegi á klst. eða mg súrefnis á kg af þurru jarðvegi á klst. Meðalmyndun koltvísýrings eða meðalsúrefnisupptaka í hverri meðhöndlun er borin saman við myndunina í samanburðarsýnunum og hlutfallslegt frávik reiknað út þar á milli.

Ef prófanir eru gerðar með öðrum íðefnum en íðefnum úr landbúnaði skal magn koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í hverju samhliða sýni ákvarðað og ferill fyrir tengsl skammtastærðar og svörunar dreginn upp til að ákvarða EC_x -gildin.

Glúkósaörvuð öndun (þ.e. mg koltvísýrings á kg af þurrum jarðvegi á klst. eða mg súrefnis á kg af þurrum jarðvegi á klst.), sem mælist í meðhöndluðu sýnunum eftir 28 daga eru borin saman við gildin fyrir samanburðarsýnin. Þessi gögn eru notuð til að reikna út hömlunargildin í hundraðshlutum fyrir hvern prófunarstyrk. Þessir hundraðshlutar eru settir fram á línuriti á móti styrk og síðan er notuð tölfraðileg aðferð til að reikna út EC_x -gildin Öryggismörk ($p = 0,95$) fyrir reiknuðu EC_x -gildin eru einnig ákvörðuð með stöðluðum aðferðum (15., 16. og 17. heimild).

2.2 TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Þegar niðurstöður úr prófunum á íðefnum úr landbúnaði eru metnar og munurinn á önduninni í sýnunum við minnsta styrkleika (þ.e. áætlaðan hámarksstyrk) og í samanburðarsýnunum er jafn eða minni en 25% við hverja sýnatöku eftir 28. dag má líta svo á að efnið hafi engin langtímaáhrif á ummyndun koltvísýrings í jarðvegi. Við mat á niðurstöðum úr prófunum á öðrum íðefnum en íðefnum úr landbúnaði eru gildin fyrir EC_{50} , EC_{25} og/eða EC_{10} notuð.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtalдар upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Fullkomnar upplýsingar um þau jarðvegssýni, sem eru notuð, þ.m.t.:

- landtilvísun fyrir staðinn (breiddar- og lengdargráða),
- upplýsingar um sögu staðarins (þ.e. gróðurvernd, meðferð með plöntuvarnarefnum, áburðargjöf, mengun fyrir slysi o.s.frv.),
- uppruni (t.d. úr jarðvegi, sem er notaður til landbúnaðar, úr skógi o.s.frv.),
- dýpt þar sem sýnin eru tekin (cm),
- innihald sands, silts og leirs (% þurrvig),
- pH (í vatni),
- innihald lífræns kolefnis (% þurrvig),
- innihald köfnunarefnis (% þurrvig),
- plúsjónaskiptageta (mmól/kg),
- upphaflegur lífmassi örvera, tilgreindur sem hundraðshluti af heildarmagni lífræns kolefnis,
- tilvísun til aðferða sem eru notaðar við ákvörðun á hverri færribreytu,
- allar upplýsingar um töku og geymslu jarðvegssýna,
- nákvæmar upplýsingar um forræktun jarðvegs, ef um hana er að ræða.

Prófunarefni:

- eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- gögn til efnafræðilegrar sanngreiningar, þ.m.t. (ef við á): byggingarformúla, hreinleiki (þ.e. hundraðshluti virks efnis ef um plöntuvarnarefni er að ræða) og köfnunarefnisinnihald.

Prófunarskýlyrði:

- nákvæmar upplýsingar um auðgun jarðvegs með lífrænu æti,
- fjöldi styrkleika prófunarefnis sem er notað og, ef við á, rökstuðningur fyrir því hvaða styrkleikar eru valdir,

- nákvæmar upplýsingar um ísetningu prófunarefnis í jarðveginn,
- ræktunarhiti,
- rakastig jarðvegsins við upphaf prófunar og meðan á henni stendur,
- aðferð sem er notuð við ræktun jarðvegsins (t.d. í lausu eða sem röð stakra undirsýna),
- fjöldi samhliða sýna,
- sýnatökutímar.

Niðurstöður:

- aðferð og búnaður sem nota skal við mælingu á öndun,
- töflusetning gagna, þ.m.t. stök gildi og meðalgildi fyrir magn koltvísýrings eða súrefnis,
- mismunur á samhliða sýnum, annars vegar meðhöndluðum sýnum og hins vegar samanburðar-sýnum,
- útskýringar á leiðréttingum í útreikningum, ef við á,
- munur á glúkósaörvaðri öndun í hundraðshlutum á hverjum sýnatökutíma eða, ef við á, gildið fyrir EC_{50} með 95% öryggismörkum, önnur EC_x -gildi (t.d. EC_{25} eða EC_{10}) með öryggisbili, svo og ferill á línuriti sem sýnir tengsl skammtastærðar og svörunar,
- tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, ef við á.
- allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna.

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. 7. kafli: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. útg., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. september, 1987.
- 4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, ritstj. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- 5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Ítalíu, 18.–20. janúar 1995.
- 6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, í „Pesticide Effects on Soil Microflora“. Ritstj. L. Somerville og M.P. Greaves, 3. kafli: 45–60.
- 8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, í „Methods of Soil Analysis – 2. hluti: Chemical and Microbiological Properties“. Agronomy Monograph nr. 9. Ritstj. A.L. Page, R.H. Miller og D.R. Keeney. 41: 831–871.
- 9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: 1. hluti. Aerobic Conditions.
- 10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

- 11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A. og Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77–81.
- 12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – 1. hluti: Substrate-induced respiration method.
- 13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – 2. hluti: Fumigation-extraction method.
- 14) Malkomes, H.P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113–120.
- 15) Litchfield, J.T. og Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99–113.
- 16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3. útg., Cambridge, London og New-York.
- 17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

C.23. UMMYNDUN Í JARÐVEGI VIÐ LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ SKILYRÐI**1. AÐFERÐ**

Þessi prófunaraðferð er sama aðferð og OECD TG 307 (2002).

1.1 INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð er byggð á fyrirliggjandi leiðbeiningum (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. og 9. heimild). Prófunaraðferðin, sem er hér er lýst, er notuð við rannsóknir á ummyndun á iðefnum í jarðvegi við loftháð og loftfirrð skilyrði. Tilraunirnar eru gerðar til að ákvarða: i) ummyndunarhraða prófunarefnisins og ii) eðli og hraða á myndun og rýrnun ummyndunarefna sem geta valdið váhrifum fyrir plöntur og jarðvegslífverur. Slíkar rannsóknir eru nauðsynlegar þegar um er að ræða iðefni sem eru sett beint í jarðveginn eða sem er líklegt að berist í jarðveginn. Niðurstöður slíkra rannsókna á rannsóknarstofum geta enn fremur nýst til að þróa sýnatöku og aðferðarlýsingu fyrir greiningar við rannsóknir á öðrum skyldum sviðum.

Rannsóknir við loftháð og loftfirrð skilyrði með einni jarðvegsgerð nægja yfirleitt til þess að meta ummyndunarferlin (8., 10. og 11. heimild). Ákvarða skal ummyndunarhraða í a.m.k. þrenns konar jarðvegsgerðum til viðbótar (8. og 10. heimild).

Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgíu á Ítalíu árið 1995 (10. heimild), var gerð sérstök samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hve margar skyldi nota í þessari prófun. Jarðvegsgerðirnar, sem eru prófaðar, skulu vera dæmigerðar fyrir þau umhverfisskilyrði þar sem gert er ráð fyrir að efnið verði notað eða losað. Til dæmis skulu iðefni, sem kunna að verða losuð í hitabeltinu eða heittempruðu beltunum, prófuð með ferrasólum eða nitósólum (FAO-kerfi). Á vinnufundinum voru einnig settar fram ráðleggingar varðandi töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna sem grundvallast á leiðbeiningum ISO (15. heimild). Í þessari aðferð er einnig fjallað um notkun jarðvegs af hrísgrjónaöknum.

1.2 SKILGREININGAR

Prófunarefni: efni sem er annaðhvort upphaflega efnasambandið (móðurefnið) eða ummyndunarefni þess.

Ummyndunarefni: efni sem myndast við lífræn eða ólífræn ummyndunarhvörf prófunarefnisins, þ.m.t. CO₂ og efni sem eru í bundnum efnaleifum.

Bundnar efnaleifar: efnasambönd í jarðvegi, plöntum eða dýrum sem haldast í efniviðinum (matrix) í formi upphaflegs efnis eða umbrots- eða ummyndunarefna þess eftir útdrátt.

Útdráttaraðferðin má ekki leiða til verulegra breytinga á sjálfum efnasamböndunum eða gerð efniviðarins. Að hluta til er unnt að skýra hvers eðlis tengin (bindingin) er með útdráttaraðferðum, sem breyta efniviðinum, og háþróaðri greiningartækni. Fram að þessu hefur t.d. á þennan hátt verið hægt að greina samgild tengi, jónísk tengi og sogtengi, svo og innlyksur. Yfirleitt dregur myndun bundinna efnaleifa verulega úr aðgengi fyrir lífverur (12. heimild) [breytt frá IUPAC 1984 (13. heimild)].

Loftháð ummyndun: efnahvörf sem verða í nálægð súrefnissameinda (14. heimild).

Loftfirrð ummyndun: efnahvörf sem verða án nálægðar súrefnissameinda (14. heimild).

Jarðvegur: blanda jarðfna og lífrænna efnisþátta; hinir síðarnefndu eru kolefnis- og köfnunarefnisauðug efnasambönd með mikilli mólþyngd, sem smáar lífverur (aðallega örverur) hrærast í. Jarðveg má meðhöndla í tvenns konar ásigkomulagi:

- a) óhreyfðan, eins og hann hefur orðið í tímans rás, í dæmigerðum lögum af ýmsum jarðvegsgerðum,
- b) hreyfðan, eins og hann er að jafnaði á ræktuðu landi eða eins og hann er þegar sýni eru tekin með greftri og notuð í þessari prófunaraðferð (14. heimild).

Sundrun (mineralisation): algert niðurbrot lífrænna efnasambanda yfir í CO₂ og H₂O við loftháð skilyrði og í CH₄, CO₂ og H₂O við loftfirrð skilyrði.

Að því er varðar þessa prófunaraðferð merkir sundrun umfangsmikið niðurbrot sem verður þegar efnasambönd, merkt með ^{14}C , eru notuð og merkt kolefnisatóm oxast og tilsvarandi magn losnar af $^{14}\text{CO}_2$ (14. heimild).

Helmingunartími: táknaður með $t_{0.5}$ – sá tími sem liður þar til 50% af prófunarefninu hefur ummyndast þegar lýsa má ummynduninni með hraðafraði af fyrstu gráðu. Þessi tími er óháður styrknum.

DT₅₀ (sundrunartími 50): sá tími sem liður þar til styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 50%. Hann er frábrugðinn helmingunartímanum, $t_{0.5}$ ef ummyndunin verður ekki samkvæmt hraðafraði af fyrstu gráðu.

DT₇₅ (sundrunartími 75): sá tími sem liður þar til styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 75%.

DT₉₀ (sundrunartími 90): sá tími sem liður þar til styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 90%.

1.3 VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefni skulu notuð til lýsingar og/eða sanngreiningar á ummyndunarefnunum með aðferðum þar sem litrófsgreinir og litskilja eru notuð.

1.4 NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARINNAR

Þessi prófun er notuð fyrir öll iðefni (ómerkt eða geislamerkt) þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar og næmar greiningaraðferðir. Hægt er að beita henni á efnasambönd sem eru lítilla rokgjörn, órokgjörn, vatnsleysanleg eða vatnsóleysanleg. Prófunin skal ekki gerð á iðefnum sem rjúka mjög úr jarðvegi (t.d. svæliefni og lífræn leysiefni) og erfitt er að halda í jarðveginum við tilraunaskilyrðin sem ríkja í þessari prófun.

1.5 UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Nota má hvort sem er ómerkt eða merkt prófunarefni til að mæla ummyndunarhraðann. Nota verður merkt efni við rannsóknir á ummyndunarferlunum og við ákvörðun á massajafnvægi. Mælt er með ^{14}C -merkingu en einnig getur verið gagnlegt að nota aðrar samsætur, t.d. ^{13}C , ^{15}N , ^3H og ^{32}P . Merkið skal, svo sem framast er kostur, vera í stöðugasta hluta eða hlutum sameindarinnar (1. heimild). Hreinleiki prófunarefnisins skal vera a.m.k. 95%.

Áður en prófun er gerð á ummyndun við loftháð og loftfírrð skilyrði í jarðvegi skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

- vatnsleysni (aðferð A.6),
- leysni í lífrænum leysiefnum,
- gufuþrýstingur (aðferð A.4) og fasti Henrys Laws,
- deilistuðull n-oktanóls/vatns (aðferð A.8),
- efnafræðilegur stöðugleiki í myrkri (vatnsrof) (aðferð C.7),
- pK_a , ef líkur eru á róteindun (protonation) eða afróteindun sameindar [OECD-leiðbeiningar 112] (16. heimild).

Aðrar gagnlegar upplýsingar geta t.d. verið gögn um eiturhrif prófunarefnisins á jarðvegsörverur [prófunaraðferð C.21 og C.22] (16. heimild).

Greiningaraðferðir (þ.m.t. útdráttur og hreinsiaðferðir) fyrir magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnisins og ummyndunarefnis þess skulu vera fyrir hendi.

(¹) Ef prófunarefnið inniheldur t.d. einn hring þarf að merkja þann hring; ef prófunarefnið inniheldur tvo eða fleiri hringi getur sérstök rannsókn verið nauðsynleg til að komast að því hvað verður um hvern merktan hring og til að fá nægar upplýsingar um myndun ummyndunarefna.

1.6 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Jarðvegssýni eru meðhöndluð með prófunarefninu og eru höfð í myrkri í lífmælingaflöskum (biometer-type flasks) eða í gegnumstreymiskerfi við stýrð skilyrði á rannsóknarstofu (stöðugt hitastig og jarðvegssraki). Eftir hæfilegan tíma eru jarðvegssýni dregin út og greind með tilliti til upphaflega efnisins og ummyndunarefna. Rokgjörnum efnum er einnig safnað til greiningar með hjálp viðeigandi ísogsbúnaðar. Ef notað er ^{14}C -merkt efni má mæla mismunandi sundrunarhraða prófunarefnisins með því að veiða það $^{14}\text{CO}_2$ sem myndast í gildru og ákvarða massajafnvægið, þ.m.t. myndun bundinna efnaleifa í jarðvegi.

1.7 GÆDAVIÐMÍÐANIR

1.7.1 Endurheimt

Útdráttur og greining á a.m.k. tvöföldum jarðvegssýnum strax eftir að prófunarefnið hefur verið sett í jarðveginn gefur fyrstu vísbendingu um endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar og samræmi aðferðarinnar sem notuð er við ísetningu prófunarefnisins. Endurheimt fyrir síðari stig tilraunanna sést af viðkomandi massajafnvægi. Endurheimt skal vera 90 – 110% fyrir merkt íðefni (8. heimild) og 70 – 110% fyrir ómerkt íðefni (3. heimild).

1.7.2 Endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðar

Unnt er að kanna endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar við magngreiningu prófunarefnis og ummyndunarefna (að frátalinni upphaflegri skilvirkni í útdrætti) með tvöfaldri greiningu á sama jarðvegsútdrætti, sem er ræktaður svo lengi að ummyndunarefni myndist.

Greiningarmörk greiningaraðferðarinnar fyrir prófunarefnið og fyrir ummyndunarefnin skulu vera a.m.k. $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ af jarðvegi (sem prófunarefni) eða 1% af skammtinum sem er notaður, hvort sem er minna af þessu tvennu. Magngreiningarmörkin skulu einnig tilgreind.

1.7.3 Nákvæmni ummyndunargagna

Aðhvarfsgreining á styrk prófunarefnisins, sem fall af tíma, gefur fullnægjandi upplýsingar um áreiðanleika ummyndunarferilsins og gerir það kleift að reikna öryggismörkin fyrir helmingunartíma (þegar um er að ræða hraðafraði af sýndarfyrstu gráðu (pseudo first order) eða DT_{50} -gildi og, ef við á, DT_{75} - og DT_{90} -gildi).

1.8 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.8.1 Búnaður og prófefni

Ræktunarkerfin eru lokuð sistöðukerfi eða heppileg gegnumstreymiskerfi (7. og 17. heimild). Dæmi um heppilegt gegnumstreymistæki fyrir ræktun jarðvegs og lífmælingaflösku eru sýnd á 1. og 2. mynd. Báðar gerðir ræktunarkerfanna hafa í senn kosti og galla (7. og 17. heimild).

Auk þess þarf venjulegan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:

- Tæki til greiningar, s.s. búnaður til gasvökvagreininga (GLC), háþrýstivökvaskiljunar (HPLC) og þunnlagsskiljunar (TLC), þ.m.t. viðeigandi greiningarkerfi til að greina bæði geislaðmerkt og ómerkt efni eða aðferð með umsnúinni samsætubynningu,
- Tæki til sanngreiningar (t.d. til massagreininga (MS), gas- og massagreininga (GC-MS), háþrýstivökvaskiljunar og massagreininga (HPLC-MS), segulómunar (NMR) o.s.frv.,
- vökvasindurteljari,
- oxari til brennslu geislavirks efnis,
- skilvinda,

- útdráttarbúnaður (t.d. skilvinduglós fyrir kaldan útdrátt og Soxhlet-tæki fyrir samfelldan útdrátt við bakstreymi),
- tækjabúnaður til að þykkja lausnir og útdregna vökva (t.d. hverfieimur),
- vatnsbað,
- vélrænn blöndunar búnaður (t.d. hnoðari eða snúningsblandari (rotating mixer)).

Prófefni, t.d.:

- NaOH, af greiningarhreinleika, 2 mól · dm⁻³, eða annar heppilegur basi (t.d. KOH eða etanólamín),
- H₂SO₄, af greiningarhreinleika, 0,05 mól · dm⁻³,
- etýlenglýkól, af greiningarhreinleika,
- föst ísogsefni, s.s. tappar úr sóðakalki og pólýúretani,
- lífræni leysar (af greiningarhreinleika), s.s. aseton, metanól o.s.frv.,
- sindurteljaravökvi.

1.8.2 Ísetning prófunarefnis

Við ísetningu og dreifingu prófunarefnis í jarðveg má leysa það upp í vatni (afjónuðu eða eimuðu) eða, þegar nauðsyn krefur, í minnsta magni af asetoni eða öðrum lífrænum leysi (6. heimild) þar sem prófunarefnið er nægilega uppleyst og stöðugt. Magn leysisins, sem notaður er, skal þó ekki hafa veruleg áhrif á virkni örvera í jarðvegi (sjá liði 1.5 og 1.9.2 – 1.9.3). Forðast skal að nota leysa sem hindra virkni örvera, s.s. klóróform, diklórmétan og aðra halógenaða leysa.

Einnig má setja prófunarefnið í sem fast efni, t.d. blandað í kvarssand (6. heimild) eða í litil undirsýni úr prófunarjarðveginum sem hafa verið loftþurrkuð og dauðhreinsuð. Ef prófunarefninu er bætt í sem uppleystu efni skal láta leysinn gufa upp áður en undirsýnið, sem efnið er sett í, er sett saman við upphaflega jarðvegssýnið sem hefur ekki verið dauðhreinsað.

Þegar um er að ræða venjuleg íðefni sem berast í jarðveginn með skólpeðju eða vegna notkunar í landbúnaði skal fyrst setja prófunarefnið í skólpeðju sem síðan er sett í jarðvegssýnið (sjá liði 1.9.2 og 1.9.3)

Ekki er mælt er með því að samsettar vörur séu notaðar að staðaldri. Ef prófunarefnið leysist treglega upp getur þó verið heppilegur kostur að nota samsett efni.

1.8.3 Jarðvegur

1.8.3.1 Val jarðvegs

Við ákvörðun á ummyndunarferli má nota dæmigerðan jarðveg; sandmold, siltmold, mold eða myldinn sand [samkvæmt flokkun FAO og USDA (18. heimild)], pH 5,5 – 8,0, innihald lífræns kolefnis 0,5 – 2,5% og mælt er með því að lífmassi örvera sé a.m.k. 1% af samanlögðu lífrænu kolefni (10. heimild).

Við rannsóknir á ummyndunarhraða skal nota a.m.k. þrenns konar viðeigandi jarðvegstegundir. Þessar jarðvegsgerðir skulu vera mismunandi að því er varðar innihald lífræns kolefnis, pH, leirinnihald og lífmassa örvera (10. heimild).

Greina skal allan jarðveg, a.m.k. með tilliti til kornastærðar (% sandur, % mold, % leir) [samkvæmt flokkun FAO og USDA (18. heimild)], pH, breytingagetu, lífræns kolefnis, þéttleika lausa jarðvegsins, vatnsheldnieiginleika ⁽²⁾ og lífmassa örvera (aðeins fyrir loftháðar rannsóknir). Viðbótarupplýsingar um eiginleika jarðvegs geta verið gagnlegar við túlkun niðurstaðna. Við ákvörðun á eiginleikum jarðvegsins má nota aðferðirnar sem mælt er með í 19., 20., 21., 22. og 23. heimild. Ákvarða skal lífmassa örvera með aðferð þar sem öndunin er örðuð með æti (SIR) (25. og 26. heimild) eða staðgönguadferðum (20. heimild).

⁽²⁾ Vatnsheldnieiginleika jarðvegs má mæla sem rakarýmd lands (field capacity), sem vatnsheldni eða sem sogspennu (pF). Sjá skýringar í 1. viðauka. Í prófunarskýrslunni er rétt að láta það koma fram hvort vatnsheldnieiginleikar og þéttleiki jarðvegsins í lausu hafi verið ákvarðaðir í sýnum af óhreyfðu landi eða sýnum af hreyfðu landi.

1.8.3.2 Taka sýna úr jarðvegi, meðhöndlum og geymsla

Nákvæmar upplýsingar eiga að vera tiltækar um sögu staðarins þar sem prófunarjarðvegurinn er tekinn. Upplýsingarnar skulu varða nákvæma staðsetningu, gróðurþekju, meðhöndlun með íðefnum, meðhöndlun með lífrænum og ólífrænum áburði, viðbætur lífrænna efna eða mengun. Hafi jarðvegurinn verið meðhöndlaður með prófunarefni eða efnum með hliðstæðri byggingu undanfarin fjögur ár skal ekki nota hann við rannsóknir á ummyndun (10. og 15. heimild).

Jarðvegssýnin skulu vera nýtekin af landinu (úr efsta jarðvegslaginu eða laginu í efstu 20 cm) með vatnsinnihaldi sem hentar fyrir sigtun. Þegar um er að ræða annan jarðveg en af hrísgrjónaökrum skal forðast að taka sýni á langvarandi tímabili þurrka, frosts eða flóða (lengri en 30 daga) eða strax í kjölfar slíkra tímabila (14. heimild). Sýnin skulu flutt á þann hátt að breytingar á vatnsinnihaldi jarðvegsins séu í lágmarki og skulu höfð í myrkri þar sem loft leikur um þau, svo sem framast er kostur. Pólýetýlenpoki, lauslega reyrður saman, nægir venjulega til að ná þessu markmiði.

Jarðvegurinn skal meðhöndlaður svo fljótt sem unnt er eftir sýnatökuna. Fjarlægja skal gróður og stærstu jarðvegslífverur og steina áður en jarðvegurinn er settur gegnum 2 mm sigti sem sýar frá smásteina, dýr og plöntuleifar. Forðast skal að þurrka og mylja jarðveginn um of áður en hann er sigtaður (15. heimild).

Ef erfitt er að ná jarðvegssýnum að vetrarlagi (jarðvegur er frosinn eða undir snjó) kann að vera hægt að ná þeim úr jarðvegi undir gróðurþekju (t.d. undir grasi eða grasi og smára) sem hefur verið geymdur í gróðrhúsi. Eindregið er mælt með því að við rannsóknirnar sé notaður jarðvegur, sem er nýtekinn af landinu, en ef geyma þarf meðhöndluð sýni áður en rannsókn hefst verða skilyrði til geymslu að vera fullnægjandi og geymslutíminn takmarkaður (við 4 ± 2 °C í þrjá mánuði að hámarki) til að viðhalda starfsemi örvera⁽³⁾. Nákvæmar leiðbeiningar um töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegs, sem nota á í tilraunir á lífrænni ummyndun, er að finna í 8., 10., 15., 26. og 27. heimild.

Áður en meðhöndlaður jarðvegur er notaður í þessari prófun þarf að forrækta hann svo að spírur geti átt sér stað og fjarlægja megi fræ og til að ná aftur jafnvægi í efnaskiptum örvera eftir þá breytingu á skilyrðum sem verður frá sýnatöku eða geymslu og þar til ræktunin fer fram. Venjulega nægir 2 – 28 daga forræktunartímabil þar sem hita- og rakaskilyrði eru höfð svipuð og í sjálfri prófuninni (15. heimild). Samanlagður geymslu- og ræktunartími skal ekki fara yfir þrjá mánuði.

1.9 FRAMKVÆMD PRÓFUNAR

1.9.1 Prófunarskilyrði

1.9.1.1 Prófunarhitastig

Allan prófunartímann skal jarðvegurinn ræktaður í myrkri við stöðugt hitastig sem er dæmigert fyrir þau loftslagsskilyrði þar sem notkun eða losun fer fram. Mælt er með hitastiginu 20 ± 2 °C fyrir öll prófunarefni sem geta borist í jarðveg í tempruðu loftslagi. Fylgjast skal með hitastiginu.

Þegar um er að ræða íðefni sem eru sett í eða losuð í kaldara loftslagi (t.d. í norðlægum löndum um haust/vetur) er rétt að rækta önnur jarðvegssýni til viðbótar við lægra hitastig (t.d. 10 ± 2 °C).

⁽³⁾ Nýlegar rannsóknarniðurstöður benda til þess að einnig megi geyma jarðveg við -20 °C í tempruðu beltunum í meira en þrjá mánuði (28. og 29. heimild) án þess að starfsemi örvera skerðist verulega.

1.9.1.2 *Rakainnihald*

Við ummyndunarprófun við loftháð skilyrði skal rakainnihald jarðvegsins ⁽⁴⁾ jafnað og haldið við pF-gildi á bilinu 2,0 til 2,5 (3. heimild). Rakainnihald jarðvegs er tilgreint sem massi vatns á móti massa af þurrum jarðvegi og skal athugað reglulega (t.d. með tveggja vikna millibili) með því að vigta ræktunarflöskurnar og vatnið sem er sett í til að bæta upp vatnstap (helst kranavatn dauðhreinsað með síun). Gæta skal þess að hindra eða halda í lágmarki tapi á prófunarefni og/eða ummyndunarefnum vegna uppgufunar og/eða ljóssundrunar (ef um hana er að ræða) meðan vatni er bætt við.

Við prófanir á ummyndun við loftfirrð skilyrði og skilyrði, sem ríkja við hrísgrjónarækt, er jarðvegurinn mettaður af vatni með því að láta flæða yfir hann.

1.9.1.3 *Skilyrði við loftháða ræktun*

Í gegnumstreymiskerfum er loftháðum skilyrðum viðhaldið með skolun öðru hverju eða með stöðugri loftræstingu með rakabættu lofti. Í lífmælingaflöskunum er loftskiptum viðhaldið með flæði.

1.9.1.4 *Dauðhreinsuð, loftháð skilyrði*

Til að fá upplýsingar um mikilvægi ólífrænnar ummyndunar prófunarefnis má dauðhreinsa jarðvegssýni (sjá nánar um dauðhreinsunaraðferðir í 16. og 29. heimild), meðhöndla þau með dauðhreinsuðu prófunarefni (t.d. þannig að lausnin er látin fara gegnum dauðhreinsunarsíu) og lofta með rakabættu, dauðhreinsuðu lofti eins og lýst er í lið 1.9.1.3. Þegar um er að ræða jarðveg af hrísgrjónaakri skal dauðhreinsa jarðveginn og vatnið og ræktunin skal fara fram eins og lýst er í lið 1.9.1.6.

1.9.1.5 *Skilyrði við loftfirrða ræktun*

Til að koma á og viðhalda loftfirrðum skilyrðum er jarðvegur, sem hefur verið meðhöndlaður með prófunarefninu og ræktaður við loftháð skilyrði í 30 daga, einn helmingunartíma eða DT₅₀ (eftir því hvert tímabilanna er styst), og síðan er hann kaffærður í vatni (hafður undir 1 – 3 cm vatnslagi) og ræktunarkerfið skolað með hvarftregri lofttegund (t.d. köfnunarefni eða argoni) ⁽⁵⁾. Prófunarkerfið verður að vera þannig að koma megi við mælingum, s.s. á pH, súrefnisstyrk og möguleika á afoxun/oxun og það skal vera með gildrubúnaði fyrir rokgjörn efni. Kerfið með lífmælingaflöskunum verður að vera lokað til að varna því að loft berist inn með flæði.

1.9.1.6 *Skilyrði við ræktun jarðvegs af hrísgrjónaökrum*

Til að rannsaka ummyndun í jarðvegi af hrísgrjónaökrum er jarðvegurinn kaffærður með vatni svo að 1 – 5 cm lag fljóti yfir og prófunarefnið sett í vatnsfasann (9. heimild). Mælt er með a.m.k. 5 cm jarðvegisdýpt. Kerfið er lofað eins og við loftháð skilyrði. Fylgjast skal með og skrá pH, súrefnisstyrk og afoxunar-/oxunarmátt vatnsfasans. Forræktun í a.m.k. tvær vikur er nauðsynleg áður en rannsóknir á ummyndun hefjast (sjá lið 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Lengd prófunar*

Rannsóknir á hraða og ferlum ummyndunar skulu að jafnaði ekki standa lengur en í 120 daga ⁽⁶⁾(3., 6. og 8. heimild), sökum þess að eftir það má búast við því að starfsemi örvera í jarðveginum minnki með tímanum í tilbúnu rannsóknarstofukerfi sem er einangrað og þar sem náttúruleg endurnýjun verður ekki. Ef nauðsynlegt er að lýsa minnkun prófunarefnisins og myndun og minnkun helstu ummyndunarefnanna geta rannsóknirnar staðið yfir lengur (t.d. 6 eða 12 mánuði) (8. heimild). Færa skal rök fyrir lengdum ræktunartímabilum í prófunarskýrslunni og gera þá grein fyrir mælingum á lífmassa meðan á ræktun stendur og við lok ræktunartímabilanna.

⁽⁴⁾ Jarðvegurinn skal hvorki vera of rakur né of þurr þannig að halda megi hæfilegri loftun og næringu fyrir örverur jarðvegsins. Til að ná mesta örveruvexti er mælt með rakainnihaldi sem er 40 – 60% af vatnsheldninni (WHC) og 0,1 – 0,33 bör (6. heimild).

Hið síðarnefnda jafngildir pF-bilinu 2,0 – 2,5. Dæmigert rakainnihald ýmissa gerða jarðvegs er tilgreint í 2. viðauka.

⁽⁵⁾ Loftháð skilyrði eru ríkjandi í yfirborðsjarðvegi og einnig í jarðveginum undir yfirborðinu eins og kemur fram í rannsóknarverkefni sem styrkt er af ESB [K. Takagi et al. (1992)]. Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17.–21. ágúst 1992, Sigtuna, Svíþjóð]. Loftfirrð skilyrði geta aðeins skapast stöku sinnum þegar land flæðir eftir mikla rigningu eða þegar skilyrði eru sköpuð til hrísgrjónaræktar á hrísgrjónaökrum.

⁽⁶⁾ Rannsóknir á loftháðum skilyrðum kunna að taka mun skemmri tíma en 120 daga að því tilskildu að endanlegum ummyndunarferlum og endanlegri sundrun sé greinilega lokið á þeim tíma. Hægt er að ljúka prófuninni eftir 120 daga eða þegar a.m.k. 90% af prófunarefninu hefur ummyndast en þó því aðeins að a.m.k. 5% CO₂ hafi myndast.

1.9.2 Framkvæmd prófunarinnar

Um 50 til 200 g af jarðvegi (þurrvigti) eru sett í hverja ræktunarflösku (sjá 1. og 2. mynd í 3. viðauka) og jarðvegurinn meðhöndlaður með prófunarefninu með einni af aðferðunum sem lýst er í lið 1.8.2. Ef lífrænnir leysar eru notaðir við ísetningu prófunarefnisins skal láta þá gufa upp úr jarðveginum. Síðan er jarðvegurinn blandaður með því að hræra í honum með spaða og/eða með því að hrista flöskuna. Ef rannsóknin fer fram við skilyrði sem ríkja við hrísgrjónarækt skal blanda jarðvegi og vatni vandlega saman eftir ísetningu prófunarefnisins. Greina skal lítil hlutasýni (t.d. 1 g) af meðhöndluðum jarðveginum með tilliti til prófunarefnisins til að ganga úr skugga um að dreifingin sé jöfn. Annarri aðferð er lýst hér á eftir.

Magn viðbættis prófunarefnis skal samsvara stærsta skammti af plöntuvarnarefni sem mælt er með í notkunarleiðbeiningum og efnið skal dreifast jafnt niður á hæfilegt dýpi á landinu (t.d. í efstu 10 cm af jarðveginum ⁽⁷⁾). Ef um er að ræða íðefni sem eru borin á laufblöð eða á jarðveg, en þeim er ekki blandað saman við hann, eru 2,5 cm t.d. hæfilegt dýpt til að reikna út hve mikið af viðkomandi íðefni skuli setja í hverja flösku. Þegar um er að ræða íðefni, sem er blandað í jarðveg, er hæfilegt sú dýpt sem er gefin upp í notkunarleiðbeiningunum. Þegar um er að ræða almenn íðefni skal ákvarða magnið, sem notað er, með hliðsjón af algengustu íkomuleiðinni. Ef helsta íkomuleiðin í jarðveginum er t.d. með skólpeðju skal setja íðefnið í eðjuna í þeim styrk sem endurspeglar þann styrk, sem vænta má að sé í eðjunni, og magn skólpeðjunnar, sem er bætt við í jarðveginum, skal svara til þess magns sem venjulega er borið á í landbúnaði. Ef þessi styrkur er ekki svo mikill að hægt sé að greina helstu ummyndunarefnið getur ræktun sérstakra jarðvegssýna með meiri styrk komið að gagni en forðast skal að nota mjög mikinn styrkleika sem hefur áhrif á starfsemi örvera í jarðveginum (sjá liði 1.5 og 1.8.2).

Þá má einnig taka meira af jarðvegi (þ.e. 1 til 2 kg) og meðhöndla með prófunarefninu, vandlega blönduðu í viðeigandi blöndunarbúnaði, og flytja síðan í minni skömmtum, 50 til 200 g, í ræktunarflöskurnar (t.d. með búnaði til að skipta sýnum). Greina skal lítil hlutasýni (t.d. 1 g) af meðhöndlaða jarðveginum með tilliti til prófunarefnisins til að ganga úr skugga um að dreifingin sé jöfn. Mælt er með þessari aðferð vegna þess að með henni er unnt að dreifa prófunarefninu jafnar í jarðveginum.

Ómeðhöndluð jarðvegssýni eru einnig ræktuð við sömu skilyrði (loftháð) og sýnin sem eru meðhöndluð með prófunarefninu. Þessi sýni eru notuð við mælingu á lífmassa meðan á rannsókn stendur og við lok hennar.

Ef prófunarefnið er leyst upp í lífrænum leysi eða leysum og sett þannig í jarðveginum eru jarðvegssýnin, sem eru meðhöndluð með sama magni leysis eða leysa, ræktuð við sömu skilyrði (loftháð) og sýnin sem eru meðhöndluð með prófunarefninu. Þessi sýni eru notuð við mælingu á lífmassa í upphafi, meðan á rannsókn stendur og við lok hennar til að kanna áhrif leysisins eða leysanna á lífmassa örvera.

Flöskurnar, sem innihalda meðhöndlaðan jarðveg, eru annaðhvort tengdar gegnumstreymiskerfinu, sem lýst er á 1. mynd, eða þeim er lokað með ísogssúlu sem er sýnd á 2. mynd (sjá 3. viðauka).

1.9.3 Sýnataka og mælingar

Par ræktunarflaskna er tekið með hæfilegu millibili og jarðvegssýnin dregin út með viðeigandi leysum með mismunandi skautun og efnagreind með tilliti til prófunarefnisins og/eða ummyndunarefna. Í vel útfærðri rannsókn skulu vera svo margar flöskur að unnt sé að taka tvær flöskur úr kerfinu í hverju tilviki þar sem sýni eru tekin. Þá eru ísogslausnir eða föst ísogsefni fjarlægð með mismunandi millibili (með 7 daga millibili fyrsta mánuðinn og eftir það með 17 daga millibili) meðan á ræktun stendur og við lok hennar fyrir hvert jarðvegssýni og efnagreind með tilliti til rokjamra efna. Auk jarðvegssýna, sem eru tekin strax eftir ísetningu efnis (sýni tekið á degi 0), skal taka a.m.k. sýni í fimm tilvikum til viðbótar í prófuninni.

(7) Upphaflegur styrkur fyrir tiltekið svæði er reiknaður með eftirfarandi jöfnu:

$$C_{\text{jarðvegur}} [\text{mg/kg}_{\text{jarðvegur}}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{jarðvegur}}/\text{m}^3]}$$

$C_{\text{jarðvegur}}$ = upphaflegur styrkur í jarðvegi $[\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}]$

A = skammtur $[\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}]$; l = þykkt jarðvegslagsins $[\text{m}]$; d = þéttleiki í lausum, þurrum jarðvegi $[\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}]$.

Almennt gildir að skömmtunin $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ gefur jarðvegssstyrk sem er um það bil $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ í 10 cm lagi (miðað við að þéttleiki þurra jarðvegsins í lausu sé $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Velja skal tímabilin þannig að hægt sé að ákvarða mynstur minnkunar prófunarefnisins og mynstur myndunar og minnkunar ummyndunarefna (t.d. 0, 1, 3, 7 dagar; 2, 3 vikur; 1, 2, 3 mánuðir, o.s.frv.).

Þegar prófunarefni, merkt með ^{14}C , er notað er óútdraganleg geislavirkni magngreind með bruna og massajafnvægi er reiknað út fyrir hvert sýnatökutímabil.

Þegar um er að ræða ræktun við loftfirrð skilyrði og ræktun jarðvegs af hrísgrjónaökrum eru jarðvegs- og vatnsfasar greindir saman með tilliti til prófunarefnisins og ummyndunarefna eða þeir eru aðskildir með síun eða skiljun áður en kemur að útdrætti og greiningu.

1.9.4 Valfrjálsar prófanir

Gagnlegt getur verið að gera frekari rannsóknir við loftháð skilyrði þar sem dauðhreinun er ekki beitt, en við annan hita og jarðvegsraka til viðbótar, til að ákvarða áhrif hita og raka í jarðvegi á ummyndunarhraða prófunarefnisins og/eða ummyndunarefni þess í jarðveginum.

Reyna má að fá frekari vitneskju um óútdraganlega geislavirkni, t.d. með því að beita vökvaútdrætti yfir marki (supercritical fluid extraction).

2. GÖGN

2.1 ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gefa skal upp magn prófunarefnis, ummyndunarefna, rokgjarnra efna (aðeins í %) og óútdraganlegra efna sem hundraðshluta af upphaflegum styrk viðbætta efnisins og, ef við á, sem $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ af jarðvegi (þurrvigt) fyrir hvert sýnatökutímabil. Massajafnvægi skal gefið upp í hundraðshlutum upphaflegs styrks viðbætta efnisins fyrir hvert sýnatökutímabil. Ef styrkur prófunarefnisins er settur á línurit á móti tíma er unnt að ákvarða helmingunartímann fyrir ummyndun prófunarefnisins eða DT_{50} . Sanngreina skal helstu ummyndunarefnin og einnig skal teikna línurit af styrk þeirra á móti tíma til að sýna hve hratt þau myndast og minnka. Helstu ummyndunarefni eru þau efni sem eru $\geq 10\%$ af notuðum skammti einhvern tíma meðan á rannsókninni stendur.

Rokgjörnu efnin, sem hafa verið fönguð í gildru, gefa nokkra vísbendingu um rokgirni prófunarefnisins og ummyndunarefna þess í jarðvegi.

Nákvæmari ákvarðanir á helmingunartíma eða DT_{50} -gildum og, ef við á DT_{75} - og DT_{90} -gildum, skulu gerðar með viðeigandi útreikningum með hraðafræðilegum reiknilíkönunum. Gera skal grein fyrir gildunum fyrir helmingunartíma og DT_{50} og lýsa skal líkaninu sem er notað, upplýsingum um hraðafræðigráðuna og ákvörðunarstuðulinn (r^2). Gera skal ráð fyrir hraðafræði af fyrstu gráðu nema ef $r^2 < 0,7$. Ef við á skal einnig ákvarða helstu ummyndunarefnin með útreikningum. Dæmum um viðeigandi líkön er lýst í 31. – 35. heimild.

Þegar um er að ræða rannsóknir, sem gerðar eru við mismunandi hitastig, skal lýsa ummyndunarhraðanum sem falli af hitastigi við hitasvið tilraunarinnar og nota Arrhenius-vensl samkvæmt eftirfarandi formúlu:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ eða } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

þar sem $\ln A$ og B eru aðhvarfsstuðlar, fengnir annars vegar út frá skurðpunkti og hins vegar út frá halla best aðlöguðu línu sem fæst með línulega aðhvarfinu $\ln k$ á móti $1/T$, k er hraðafastinn við hitastigið T og T er hitastig á Kelvin. Gæta skal að því að Arrhenius-vensl eru aðeins gild á takmörkuðu hitasviði við aðstæður þar sem ummyndunin ræðst af starfsemi örvera.

2.2 MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Þó að rannsóknirnar fari fram í tilbúnu rannsóknarstofukerfi geta niðurstöðurnar þó gert það kleift að ákvarða ummyndunarhraða prófunarefnisins og einnig myndunar- og minnkunarhraða ummyndunarefna við þau skilyrði sem ríkja á viðkomandi landi (36. og 37. heimild).

Rannsókn á ummyndunarleið prófunarefnis veitir upplýsingar um á hvern hátt bygging ísetts efnis breytist í jarðveginum með efnahvörfum og hvörfum af völdum örvera.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Í prófunarskýrslunni skal koma fram:

Prófunarefni:

- almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla (þ.m.t. staðsetning merkis eða merkja ef geislamerkt efni eru notuð) og þeir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli (sjá lið 1.5),
- hreinleiki (óhreinindi) prófunarefnis,
- geislaefnafræðilegur hreinleiki merktra iðefna og sérstök virkni (ef við á).

Viðmiðunarefni:

- efnaheiti og bygging viðmiðunarefnisins sem er notað til lýsingar og/eða sanngreiningar á ummyndunarefninu.

Prófunarjarðvegur:

- nákvæm lýsing á staðnum,
- dagsetning og aðferð við sýnatöku,
- eiginleikar jarðvegsins, s.s. pH, innihald lífræns kolefnis, kornastærð (hundraðshlutar sands, silts og leirs), plúsjónaskiptageta, þéttleiki lausa jarðvegsins, vatnsheldnieiginleikar og lífmassi örvera,
- hve lengi jarðvegurinn hefur verið geymdur og (ef svo er) geymsluskilyrði.

Prófunarskilyrði:

- dagsetningar rannsókna,
- magn sem notað er af prófunarefninu,
- leysar, sem eru notaðir, og aðferð við notkun prófunarefnisins,
- þyngd jarðvegs sem er meðhöndlaður í upphafi og allra sýna sem eru tekin til greiningar,
- lýsing á ræktunarkerfinu sem er notað,
- loftstreymi (aðeins fyrir gegnumstreymiskerfi),
- hitastig í prófununum,
- jarðvegsraki við ræktun,
- upphaflegur lífmassi örvera í loftháðri rannsókn, meðan hún stendur yfir og við lok hennar,
- pH, súrefnisstyrkur og afoxunar-/oxunarmáttur í upphafi, meðan rannsókn stendur og við lok rannsókna við loftfyrirð skilyrði og í rannsókn á jarðvegi af hrisgrjónaökrum,
- aðferð eða aðferðir við útdrátt,
- aðferðir við magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnis og helstu ummyndunarefna í jarðvegi og í ísogsefnum,
- fjöldi samhliða sýna og fjöldi samanburðarsýna.

Niðurstöður:

- niðurstöður ákvörðunar á starfsemi örvera,
- endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðanna sem eru notaðar,
- endurheimt (gildi (í %) fyrir gilda rannsókn eru tilgreind í lið 1.7.1),
- töflur með niðurstöðum, sem gefnar eru upp sem % af notuðum, upphaflegum skammti, og, ef við á, sem $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ af jarðvegi (þurrvigt),
- massajafnvægi í rannsóknum og við lok þeirra,
- lýsing á óútdraganlegri (bundinni) geislavirkni eða efnaleifum í jarðvegi,
- magngreining á því CO_2 , sem losnar, og á rokgjörnum efnasamböndum,
- línurit sem sýnir styrk prófunarefnisins í jarðvegi á móti tíma, svo og, ef við á, einnig fyrir helstu ummyndunarefni,
- helmingunartími prófunarefnisins eða DT_{50} , DT_{75} og DT_{90} og, ef við á, fyrir helstu ummyndunarefni, þ.m.t. öryggismörk,
- mat á ólífrænum niðurbrotshraða við dauðhreinsuð skilyrði,
- mat á ummyndunarhraða prófunarefnisins og, ef við á, helstu ummyndunarefna,
- ætluð ummyndunarferli, eftir því sem við á,
- umræða og túlkun niðurstaðna,
- óunnin gögn (t.d. skiljurit fyrir sýni, útreikningar á ummyndunarhraða sýna og aðferðir til að sanngreina ummyndunarefni).

4. HEIMILDASKRÁ

- 1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 3) Evrópusambandið (ESB) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. II. viðauki, A-hluti og III. viðauki, A-hluti: Fate and Behaviour in the Environment.
- 4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- 6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil - 1. hluti – Aerobic conditions.
- 7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- 8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, ritstj.
- 9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

- 10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Ítalíu, 18. – 20. janúar 1995.
- 11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, ritstj.), Academic Press, 123–157.
- 12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley. VCH (1998).
- 13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).
- 14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (samþykkt 12. maí 1981).
- 15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – 6. hluti: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 16) V. viðauki við tilskipun 67/548/EBE.
- 17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, ritstj. J. Wiley & Sons. 1. bindi, 85–114.
- 18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- 19) Methods of Soil Analysis (1986). 1. hluti, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, ritstj. Agronomy Series nr. 9, 2. útg..
- 20) Methods of Soil Analysis (1982). 2. hluti, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller og D.R. Keeney, ritstj. Agronomy Series nr. 9, 2. útg.
- 21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. 1. útg.
- 22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- 23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- 24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215–221.
- 25) ISO 14240-1 og 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – 1. hluti: Substrate-induced respiration method. 2. hluti: fumigation-extraction method.
- 26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. Í: „Pesticide Effects on Soil Microflora“. L. Somerville, M.P. Greaves, ritstj. Taylor & Francis, 45–60.
- 27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105–120.
- 28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59–63 (SETAC-Europe).
- 29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68–69 (SETAC-Europe).
- 30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197–200.

- 31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Dieldrin im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.
 - 32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.
 - 33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. Í: „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque og V.H. Freed, ritstj., 135–172.
 - 34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188–204.
 - 35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.
 - 36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.
 - 37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. Í „Interactions between Herbicides and the Soil“ (R.J. Hance, ritstj.), Academic Press, 83–122.
-

1. VIÐAUKI

SOGSPENNA (WATER TENSION), RAKARÝMD LANDS (FC) OG VATNSHELDNI (WHC) ⁽¹⁾

Hæð vatnssúlu [cm]	pF ^(a)	bör ^(b)	Athugasemdir
10 ⁷	7	10 ⁴	Þurr jarðvegur
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Visnunarmörk
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	
10 ²	2	0,1	} Svið fyrir rakarýmd lands ^(d)
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Vatnsheldni (WHC) (nálgun)
1	0	0,001	Vatnsmettaður jarðvegur

^(a) pF = logri af vatnssúlu í cm.

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

^(c) Samsvarar nálægt 10% vatnsinnihaldi í sandi, 35% í mold og 45% í leir.

^(d) Rakarýmd lands er ekki stöðug heldur breytist hún eftir jarðvegsgerð og er frá pF 1,5 til 2,5.

Sogspenna er mæld sem lengd vatnssúlu í cm eða í börum. Vegna þess hve sogspenna spannar vítt svið er hún einfaldlega gefin upp sem pF-gildi sem jafngildir logranum af lengd vatnssúlu í cm.

Rakarýmd lands er skilgreind sem það magn vatns sem náttúrulegur jarðvegur getur haldið móti þyngdaraflinu tveimur dögum eftir langt regntímabil eða eftir nægilega vökvun. Hún er ákvörðuð á staðnum á óhreyfðu landi. Mælingin gildir því ekki fyrir sýni á rannsóknarstofu úr hreyfðum jarðvegi. Verulegur, kerfisbundinn munur í dreifni getur komið fram í FC-gildum sem eru ákvörðuð í hreyfðum jarðvegi.

Vatnsheldni (WHC) er ákvörðuð á rannsóknarstofu í óhreyfðum og hreyfðum jarðvegi með því að metta jarðvegssúlu af vatni með hárpípukrafti. Þetta er einkum gagnlegt þegar um er að ræða hreyfðan jarðveg og vatnsheldnin getur orðið allt að 30% meiri en rakarýmd lands (1. heimild). Í tilraunum er enn fremur auðveldara að ákvarða hana en áreiðanleg FC-gildi.

⁽¹⁾ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

2. VIÐAUKI

**RAKAINNIHALD JARÐVEGS (g vatns í 100 g af þurrum jarðvegi) Í MISMUNANDI
JARÐVEGSGERÐUM FRÁ ÝMSUM LÖNDUM**

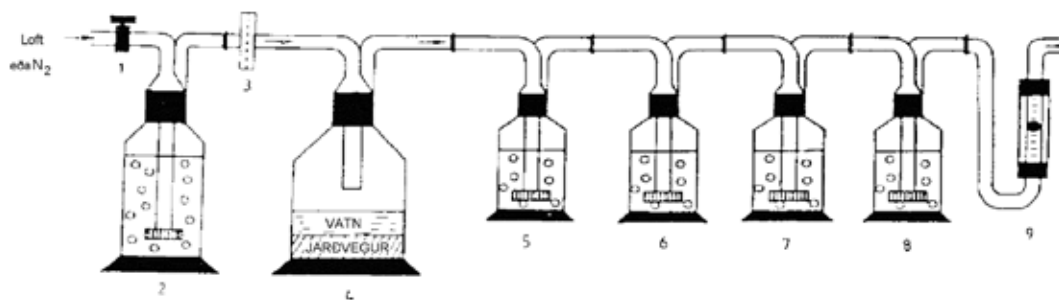
Jarðvegsgerð	Land	Rakainnihald		
		WHC ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Sandur	Þýskaland	28,7	8,8	3,9
Myldinn sandur	Þýskaland	50,4	17,9	12,1
Myldinn sandur	Sviss	44,0	35,3	9,2
Siltmold	Sviss	72,8	56,6	28,4
Leirmold	Brasilía	69,7	38,4	27,3
Leirmold	Japan	74,4	57,8	31,4
Sendin mold	Japan	82,4	59,2	36,0
Siltmold	BNA	47,2	33,2	18,8
Sendin mold	BNA	40,4	25,2	13,3
⁽¹⁾ Vatnsheldni				

3. VIÐAUKI

Mynd 1

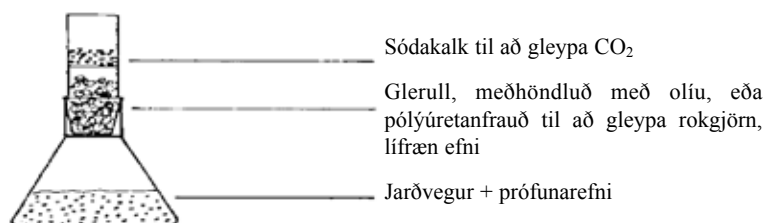
Dæmi um gegnumstreymisbúnað fyrir rannsóknir á ummyndun iðefna í jarðvegi (1. og 2. heimild)

- 1: nálarloki
- 2: gasþvottaflaska með vatni í
- 3: himnusía (ultramembrane) (aðeins við dauðhreinsaðar aðstæður), opstærð 0,2 µm
- 4: flaska fyrir efnaskipti í jarðvegi (aðeins vatnsmettaður fyrir loftfirrð skilyrði og skilyrði sem ríkja á hrisgrjónaðkrum),
- 5: etýlenglýkólgildra fyrir lífræn, rokgjörn efnasambönd,
- 6: brennisteinssýrugildra fyrir basísk, rokgjörn efnasambönd
- 7, 8: natriumhýdroxíðgildra fyrir CO₂ og önnur súr, rokgjörn efni,
- 9: rennismælir.



2. mynd

Dæmi um lífmælingaflösku fyrir rannsóknir á ummyndun iðefna í jarðvegi (3. heimild)



- (1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, ritstj.), Academic Press, 123–157.
- (2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, ritstj. J. Wiley & Sons. 1. bindi, 85–114.
- (3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

C.24. UMMYNDUN Í KERFUM FYRIR VATNASET VIÐ LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRD SKILYRÐI**1. AÐFERÐ**

Þessi prófunaraðferð er sama aðferð og OECD TG 308 (2002).

1.1 INNGANGUR

Íðefni geta komist í grunnt eða djúpt yfirborðsvatn eftir ýmsum leiðum, s.s. með beinni ísetningu, úðun, afrennsli, framræslu, úrgangslausun, fráveitu frá iðnaði, heimilum eða landbúnaði og ákomu úr andrúmsloftinu. Þessi prófunaraðferð er lýsing á rannsóknarstofuaðferð til að meta loftháða og loftfirrða ummyndun lífrænna íðefna í vatnaseti. Hún er byggð á fyrirbyggjandi leiðbeiningum (1., 2., 3., 4., 5. og 6. heimild). Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgíu á Ítalíu árið 1995 (7. heimild), var gerð sérstök samþykkt um það hve mörg setlög og hvaða gerðir þeirra skyldi nota í þessari prófun. Þar voru einnig settar fram leiðbeiningar varðandi töku, meðhöndlun og geymslu sýna úr seti, byggð á leiðbeiningum ISO (8. heimild). Slíkar rannsóknir eru nauðsynlegar þegar um er að ræða íðefni sem eru sett beint í vatn eða sem er líklegt að berist í vatn eftir þeim leiðum sem lýst var hér að framan.

Í náttúrulegu vatnaseti eru oft loftháð skilyrði í vatnsfasanum efst. Í yfirborðslagi setsins geta skilyrði hvort heldur verið loftháð eða loftfirrð en neðar í setinu eru þau venjulega loftfirrð. Með hliðsjón af þessu er því í þessu skjali lýst prófunum bæði við loftháð og loftfirrð skilyrði. Í loftháðu prófuninni er líkt eftir loftháðri vatnssúlu yfir loftháðu setlagi og þar undir er stigull með loftfirrðum skilyrðum. Í prófun við loftfirrð skilyrði er líkt eftir algerlega loftfirrðu kerfi vatns og sets. Ef aðstæður krefjast þess að víkið sé verulega frá þessum leiðbeiningum, t.d. með því að nota ósnerta setkjarna eða set sem kann að hafa komist í snertingu við prófunarefnið, má beita öðrum aðferðum (9. heimild).

1.2 SKILGREININGAR

Í öllum tilvikum skal nota staðlaðar, alþjóðlegar einingar (SI-einingar).

Prófunarefni: efni sem er annaðhvort upphaflega efnasambandið (móðurefnið) eða ummyndunarefni þess.

Ummyndunarefni: efni sem myndast við lífræn eða ólífræn ummyndunarhvörf prófunarefnisins, þ.m.t. CO₂ og bundnar efnaleifar.

Bundnar efnaleifar: efnasambönd í jarðvegi, plöntum eða dýrum sem haldast í efniviðinum í formi upphaflegs efnis eða umbrotsefna þess eftir útdrátt. Útdráttaraðferðin má ekki leiða til verulegra breytinga á sjálfum efnasamböndunum eða gerð efniviðsins. Að hluta til er unnt að skýra hvers eðlis tengin (bindingin) eru með útdráttaraðferðum, sem breyta efniviðinum, og háþróaðri greiningartækni. Fram að þessu hefur t.d. á þenna hátt verið hægt að greina samgild tengi, jónísk tengi og sogtengi, svo og innlyksur. Yfirleitt dregur myndun bundinna efnaleifa verulega úr aðgengi fyrir lífverur (10. heimild) [breytt frá IUPAC 1984 (11. heimild)].

Loftháð ummyndun (oxun): efnahvörf sem verða í nálægð súrefnissameinda (12. heimild).

Loftfirrð ummyndun (afoxun): efnahvörf sem verða án nálægðar súrefnissameinda (12. heimild).

Náttúrulegt vatn: yfirborðsvatn sem fæst úr tjörnum, ám, lækjum o.s.frv.

Set: blanda jarðefna og lífrænna efnisþátta; hinir síðarnefndu eru kolefnis- og köfnunarefnisauðug efnasambönd með mikilli mólþyngd. Það fellur út úr náttúrulegu vatni og myndar skilflöt með því vatni.

Sundrun (mineralisation): algert niðurbrot lífrænna efnasambanda yfir í CO₂ og H₂O við loftháð skilyrði og í CH₄, CO₂ og H₂O við loftfirrð skilyrði. Að því er varðar þessa prófunaraðferð merkir sundrun umfangsmikið niðurbrot sameinda sem verður þegar merkt kolefnisatóm eru oxuð eða afoxuð og tilsvareandi magn af ¹⁴CO₂ eða ¹⁴CH₄ losnar.

Helmingunartími: táknaður með $t_{0.5}$, sá tími sem liður þar til 50% af prófunarefninu hefur ummyndast þegar lýsa má ummynduninni með hraðafraði af fyrstu gráðu. Þessi tími er óháður upphaflegum styrk.

DT₅₀ (sundrunartími 50): sá tími sem liður þar til upphaflegur styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 50%.

DT₇₅ (sundrunartími 75): sá tími sem liður þar til upphaflegur styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 75%.

DT₉₀ (sundrunartími 90): sá tími sem liður þar til upphaflegur styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 90%.

1.3 VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefni skulu notuð til sanngreiningar og magngreiningar á ummyndunarefnunum með aðferðum þar sem lítrófsgreinir og litskilja eru notuð.

1.4 UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Nota má hvort sem er ómerkt eða merkt prófunarefni til að mæla ummyndunarhraðann, þótt fremur sé mælt með því að merkt efni séu notuð. Nota verður merkt efni við rannsóknir á ummyndunarferlunum og við ákvörðun á massajafnvægi. Mælt er með ¹⁴C-merkingu en einnig getur verið gagnlegt að nota aðrar samsætur, t.d. ¹³C, ¹⁵N, ³H og ³²P. Merkt efnið skal, ef unnt er, vera í stöðugasta hluta eða hlutum sameindarinnar ⁽¹⁾. Efnafræðilegur og geislaefnafræðilegur hreinleiki prófunarefnisins skal vera a.m.k. 95%.

Áður en prófun er gerð skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

- a) vatnsleysni (aðferð A.6),
- b) leysni í lífrænum leysum,
- c) gufuþrýstingur (aðferð A.4) og fasti Henrys Laws,
- d) deilistuðull n-oktanóls/vatns (aðferð A.8),
- e) ásogsstuðull (K_d , K_f eða K_{oc} , eftir því sem við á) (aðferð C.18),
- f) vatnsrof (aðferð C.7),
- g) klofnunarstuðull (pK_a) [OECD-leiðbeiningar 112] (13. heimild),
- h) efnafræðileg bygging prófunarefnisins og staðsetning samsætumerkis eða -merkja, ef við á.

Athugasemd: Skrá skal við hvaða hitastig þessar mælingar eru gerðar.

Aðrar gagnlegar upplýsingar geta t.d. verið gögn um eiturhrif prófunarefnisins á örverur, gögn um auðveldan og/eða eðlislægan lífbrjótanleika og gögn um loftháða og loftfirrða ummyndun í jarðvegi.

Greiningaraðferðir (þ.m.t. útdráttur og hreinsiaðferðir) fyrir magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnisins og ummyndunarefna þess í vatni og seti skulu vera fyrir hendi (sjá lið 1.7.2).

1.5 GRUNDVÖLLUR PRÓFUNARAÐFERÐAR

Í prófunaraðferðinni, sem hér er lýst, er notað vatnaset við loftháð og loftfirrð skilyrði (sjá 1. viðauka). Það gefur kost á eftirfarandi:

- i) mælingu á ummyndunarhraða prófunarefnisins í kerfi vatns og sets,
- ii) mælingu á ummyndunarhraða prófunarefnisins í setinu,

⁽¹⁾ Ef prófunarefnið inniheldur t.d. einn hring þarf að merkja þann hring; ef prófunarefnið inniheldur tvo eða fleiri hringi getur sérstök rannsókn verið nauðsynleg til að meta það hvað verður um hvern merktan hring og til að fá nægar upplýsingar um myndun ummyndunarefna.

- iii) mælingu á sundrunarhraða prófunarefnisins og/eða ummyndunarefna þess (þar sem prófunarefni, merkt með ^{14}C , er notað),
- iv) sanngreiningu og magngreiningu ummyndunarefna í vatni og seti, þ.m.t. massajafnvægi (þegar merkt prófunarefni er notað),
- v) mælingu á því hvernig prófunarefnið og ummyndunarefni þess skiptist milli fasanna tveggja á ræktunartímabili í myrkri (til að forðast t.d. þörungablóma) við stöðugt hitastig. Ákvarða skal helmingunartíma og gildi fyrir DT_{50} , DT_{75} og DT_{90} liggi næg gögn fyrir en ekki skal framreikna þau langt fram yfir tilraunartímabilið (sjá lið 1.2).

Nota þarf a.m.k. tvær gerðir af seti og tilheyrandi vatn, bæði við loftháð og loftfirrð prófunarskilyrði (7. heimild). Þó geta komið upp aðstæður þar sem nota þarf fleiri en tvær gerðir vatnasetts, t.d. þegar um er að ræða íðefni sem geta verið í ferskvatni og/eða sjó.

1.6 NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARINNAR

Þessi prófun er almennt notuð fyrir íðefni (ómerkt eða geislamerkt) þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar og næmar greiningaraðferðir. Hana má nota fyrir efnasambönd sem eru lítillega rokgjörm eða órokgjörm og efnasambönd sem eru vatnsleysanleg eða torleysanleg í vatni. Prófunin skal ekki gerð á íðefnum sem rjúka mjög upp úr vatni (t.d. svæliefni og lífrænir leysar) og haldast því ekki í vatninu og/eða setinu við tilraunaskilyrðin í þessari prófun.

Aðferðin hefur fram að þessu verið notuð til að rannsaka ummyndun íðefna í ferskvatni og seti en henni má raunar einnig beita á kerfi í árósum og sjó. Hún hentar ekki til að líkja eftir aðstæðum í straumvatni (t.d. ám) eða á rúmsjó.

1.7 GÆÐAVIDMIÐANIR

1.7.1 Endurheimt

Útdráttur og greining á a.m.k. tvöföldum sýnum af vatni og seti strax eftir að prófunarefninu hefur verið bætt við gefur fyrstu vísbendingu um endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar og samræmi aðferðarinnar sem notuð er við ísetningu prófunarefnisins. Endurheimt fyrir síðari stig tilraunanna sjást af viðkomandi massajafnvægi (þegar merkt efni er notað). Endurheimt skal vera 90 – 110% fyrir merkt íðefni (6. heimild) og 70 – 110% fyrir ómerkt íðefni.

1.7.2 Endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðar

Unnt er að kanna endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar við magngreiningu prófunarefnis og ummyndunarefna (að frátalinni upphaflegri skilvirkni í útdrætti), með tvöfaldri greiningu á sama útdrætti úr vatns- eða setsýnum, sem eru ræktuð svo lengi að ummyndunarefni myndist.

Greiningarmörk greiningaraðferðarinnar fyrir prófunarefnið og fyrir ummyndunarefnin skulu vera a.m.k. $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ í vatni eða seti (sem prófunarefni) eða 1% af upphaflegum skammti sem er settur í prófunarkerfið, hvort sem minna er af þessu tvennu. Magngreiningarmörkin skulu einnig tilgreind.

1.7.3 Nákvæmni ummyndunargagna

Aðhvarfsgreining á styrk prófunarefnisins, sem fall af tíma, gefur fullnægjandi upplýsingar um nákvæmni ummyndunarefnisins og gerir það kleift að reikna öryggismörkin fyrir helmingunartíma (þegar um er að ræða hraðafraði af sýndarfyrstu gráðu) eða DT_{50} -gildi og, ef við á, DT_{75} - og DT_{90} -gildi.

1.8 LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.8.1 Prófunarkerfi og búnaður

Gera skal rannsóknina í glerlátum (t.d. flöskum, skilvinduglösum) nema fyrir upplýsingar (s.s. deilistuðull n-oktanóls og vatns, upplýsingar um sog o.s.frv.) bendi til þess að prófunarefnið kunni að ásogast á gler og í því tilviki má velta fyrir sér notkun annars efnis (t.d. teflons).

Ef vitað er að prófunarefni ásogast á gler er hugsanlega hægt að ráða bót á þessum vanda með því að beita einni eða fleiri af eftirfarandi aðferðum:

- að ákvarða massa prófunarefnisins og ummyndunarefna sem ásogast á gler,
- að sjá til þess að öll glerlát séu skuluð með leysi í lok prófunarinnar,
- að nota samsettar vörur (sjá einnig lið 1.9.2),
- að nota meira magn af meðleysi (co-solvent) við ísetningu prófunarefnisins í kerfið en ef meðleysir er notaður má hann ekki vera þeirrar gerðar að hann hvarfist við prófunarefnið.

Dæmi um venjulegan prófunarbúnað, þ.e. gasgegnumstreymisbúnað og lífmælingakerfi eru sýnd á 2. og 3. mynd (14. heimild). Öðrum gagnlegum ræktunarkerfum er lýst í 15. heimild. Tilraunabúnaðurinn skal vera þannig gerður að loft- og köfnunarefnisskipti geti orðið og að fanga megi rokgjörn efni í gildru. Stærðarmál búnaðarins skulu vera þannig að kröfur um prófunina séu uppfylltar (sjá lið 1.9.1). Loftun skal annaðhvort vera með vægri loftbólun eða með því að láta loft eða köfnunarefni streyma yfir vatnsflötinn. Í síðara tilvikinu getur verið ráðlegt að hræra varlega í vatninu ofan frá svo að súrefnið og köfnunarefnið blandist vatninu betur. Ekki skal nota loft án CO₂ þar eð það getur valdið því að súrustig vatnsins hækki. Í báðum tilvikum er óæskilegt að hreyft sé við setinu og skal forðast það eftir föngum. Prófa skal iðefni, sem eru lítilla rokgjörn, í lífmælingakerfi þar sem hrært er varlega í vatnsyfirborðinu. Einnig má nota lokuð ilát með kollrúmi sem er fyllt andrúmslofti eða köfnunarefni og þar sem eru innbyggð ilát til að fanga rokgjörn efni (16. heimild). Nauðsynlegt er að skipta reglulega um loft í kollrúminu í loftháðri prófun til að bæta upp súrefnisupptöku lífmassans.

Heppileg efni í gildrum til að safna rokgjörnum ummyndunarefnum geta t.d. verið 1 mól · dm⁻³ kalíum- eða natriumlausnir fyrir koltvísýring (²) og etýlenglýkól, etanólámín eða 2% paraffín í xýleni fyrir lífræn efnasambönd, en fleiri kostir standa til boða. Rokgjörnum efnunum, t.d. metani, sem myndast við loftfirrð skilyrði, má safna með sameindasíum. Brenna má rokgjörn efni af þessu tagi, svo að myndist CO₂, t.d. með því að láta gasið fara gegnum kvarsrör fyllt með CuO við hitastigið 900 °C og fanga það CO₂, sem myndast, í gleypi (absorber) með lút (17. heimild).

Nauðsynlegt er að hafa rannsóknarstofubúnað fyrir efnagreiningu á prófunarefni og ummyndunarefnum (t.d. fyrir gas-vökvagreiningu (GLC), háþrýstivökvaskiljun (HPLC), þunnlagsskiljun (TLC), massagreiningu (MS), gas- og massagreiningu (GC-MS), vökvaskiljun og massagreiningu (LC-MS), segulólun (NMR) o.s.frv.), þ.m.t. skynjunarkerfi fyrir geislamerkt eða ómerkt iðefni, eftir því sem við á. Ef geislamerkt efni er notað er einnig þörf á vökvásindurteljara og brennsluofni (til brennslu setsýna áður en kemur að greiningu á geislavirkni).

Einnig þarf að vera hendi annar staðlaður rannsóknarstofubúnaður fyrir eðlisefnafræðilegar og líffræðilegar ákvarðanir (sjá töflu 1, lið 1.8.2.2), glervara, iðefni og prófefni eftir þörfum.

1.8.2 Val og fjöldi sýna úr vatnaseti

Ávallt skal velja sýnatökustaði í samræmi við tilganginn með prófuninni. Við val á sýnatökustað þarf að taka tillit til fyrri sögu um hugsanlega losun frá landbúnaði, iðnaði eða heimilishaldi á vatnasviðinu og einnig skal kanna vatnið ofan viðkomandi svæðis. Ekki skal nota set hafi það mengast af prófunarefninu eða efnunum með hliðstæða byggingu síðustu fjögur árin.

(²) Þar eð þessar basísku ísogslausnir gleypa einnig koltvísýring úr loftrástlofti og þann koltvísýring, sem myndast við loftskipti í loftháðum tilraunum, þarf að skipta reglulega um þær til að komast hjá því að þær mettist og missi þær með ísogshæfni sína.

1.8.2.1 *Val á seti*

Í lofháðum rannsóknum eru vanalega notaðar tvær gerðir af seti (7. heimild). Þær tvær gerðir sets, sem eru valdar, skulu vera ólíkar að því er varðar lífrænt kolefnisinnihald og kornastærð. Önnur gerðin skal innihalda mikið af lífrænu kolefni (2,5 – 7,5%) og vera finkornótt en hin gerðin skal innihalda lítið af lífrænu kolefni (0,5 – 2,5%) og vera grófkornótt. Munurinn á innihaldi lífræns kolefnis skal að jafnaði vera a.m.k. 2%. „Finkornótt set“ er skilgreint sem set þar sem [leir + silt]-innihaldið ⁽³⁾ er > 50% og „grófkornótt set“ er skilgreint sem set þar sem [leir + silt]-innihaldið er < 50%. Munurinn á innihaldi [leirs + silts] í þessum tveimur gerðum af seti skal að jafnaði vera a.m.k. 20%. Í tilvikum þar sem iðefni geta einnig borist í sjó skal a.m.k. annað kerfi vatns og sets vera úr sjó.

Í rannsókn sem fer að öllu leyti fram við loftfirrð skilyrði skal tekið sýni úr tvenns konar seti (ásamt því vatni sem fylgir) úr loftfirrðum stöðum í yfirborðsvatnshloti (7. heimild). Bæði set- og vatnsfasinn skulu meðhöndlaðir og fluttir varlega og þannig að súrefni komist ekki að.

Aðrar færðibreytur kunna að vera mikilvægar við val á seti og skal vega þær og meta í hverju tilviki um sig. Til dæmis myndi sýrustigssvið sets hafa mikla þýðingu fyrir prófunarefni þar sem ummyndun og/eða sog kann að vera háð sýrustigi. Ef sog er háð sýrustigi getur það komið fram í pK_a-gildi prófunarefnisins.

1.8.2.2 *Lýsing á sýnum vatns og sets*

Í töflunni hér á eftir eru tilgreindar lykilmælingar, bæði fyrir vatn og set, sem nauðsynlegt er að meta og gera grein fyrir (með tilvísun í aðferðina sem er notuð) og einnig á hvaða stigi prófunarinnar þessar færðibreytur skulu ákvarðaðar. Aðferðunum, sem eru notaðar til að ákvarða þessar færðibreytur, er lýst í 18., 19., 20. og 21. heimild.

Enn fremur getur verið nauðsynlegt að ákvarða aðrar færðibreytur og skrá þær í hverju tilviki um sig (t.d. fyrir ferskvatn: agnir, basastig, harka, leiðni, NO₃/PO₄ (hlutfall og gildi hvors um sig); fyrir set: plúsónaskiptageta, vatnsheldni, karbónat, heildarköfnunarefni og -fosfór, og fyrir sjávarkerfi: selta). Einnig getur þurft að greina set og vatn með tilliti til nitrats, sulfats, aðgengilegs járn og hugsanlega annarra rafeindaþega þegar metin eru skilyrði til oxunar/afoxunar, einkum í tengslum við loftfirrða ummyndun.

Mæling á færðibreytum fyrir lýsingu á sýnum vatns og sets (7., 22. og 23. heimild)

Færðibreyta	Stig prófunaraðferðar					
	sýnataka	eftir-meðhöndlun	upphaf aðlögunar	upphaf prófunar	í prófun	lok prófunar
Vatn						
Uppruni/upptök	x					
Hitastig	x					
pH	x		x	x	x	x
Lífrænt kolefni (heild)			x	x		x
styrkur O ₂ *	x		x	x	x	x
Oxunar-/afoxunarmáttur*			x	x	x	x
Set						
Uppruni/upptök	x					
Dýpt setlags	x					
pH		x	x	x	x	x
Dreifing kornastærðar		x				

⁽³⁾ [Leir + silt] er sá jarðefnahluti setsins þar sem kornastærð er < 50 µm

Færibreyta	Stig prófunaraðferðar					
	sýnataka	eftir-meðhöndlun	upphaf aðlögunar	upphaf prófunar	í prófun	lok prófunar
Lífrænt kolefni (heild)		x	x	x		x
Lífmassi örvera **		x		x		x
Oxunar-/afoxunarmáttur*	Athugun (litur/lykt)		x	x	x	x

* Nýlegar rannsóknir hafa sýnt að mælingar á styrk súrefnis í vatni og á oxunar-/afoxunarmætti segja lítið til um verkunarmáta og hafa lítið forspárgildi að því er varðar vöxt og þróun örverusamfélaga í yfirborðsvatni (24. og 25. heimild). Ákvörðun á lífrænni súrefnisþörf (BOD, við sýnatöku, upphaf og lok prófunar) og á styrk snefilefna og helstu næringarefna, Ca, Mg og Mn, (við upphaf og lok prófunar) í vatni og við mælingu á heildarmagni N og heildarmagni P í seti (við sýnatöku og lok prófunar) getur verið betra tæki til að túlka og meta loftháðan, lífrænan ummyndunarhraða og ummyndunarferlin.

** Aðferð byggð á öndun lífvera (26. heimild), svælingaraðferð (27. heimild) eða mæling á fjölda (t.d. bakteríur, geislasveppir, sveppir og þyrpingar sem heild) fyrir loftháðar rannsóknir; myndunarhraði metans fyrir rannsóknir við loftfirrð skilyrði.

1.8.3 Taka sýna, meðhöndlun þeirra og geymsla

1.8.3.1 Sýnataka

Við töku sýna úr seti skal styðjast við drögin að leiðbeiningum ISO um töku sýna úr botnseti (8. heimild). Taka skal setsýni úr öllu efsta lagi setsins (efstu 5 til 10 cm). Taka skal vatn, sem fylgir sýnunum, á sama stað og sama tíma og sýnið er tekið. Í rannsókn við loftfirrð skilyrði skal taka sýni og tilheyrandi vatn án þess að súrefni komi þar nærri og súrefni má heldur ekki komast að þeim við flutning (28. heimild) (sjá lið 1.8.2.1). Nokkrum tegundum sýnatökubúnaðar er lýst í 8. og 23. heimild.

1.8.3.2 Meðhöndlun

Setið er aðskilið frá vatninu með síun og setið votsigtað gegnum 2 mm sigti og notað til þess umframvatn af sama stað, sem síðan er fleygt. Þá er þekktu magni af seti og vatni blandað saman í æskilegum hlutföllum (sjá lið 1.9.1), það sett í ræktunarflöskur og búið undir aðlögunartímamann (sjá lið 1.8.4). Í rannsókn við loftfirrð skilyrði skulu öll stig meðhöndlunarinnar fara fram án þess að súrefni komi þar nærri (29., 30., 31., 32. og 33. heimild).

1.8.3.3 Geymsla

Eindregið er mælt með því að nota nýtekin sýni og vatn en ef nauðsynlegt er að geyma sýnin og vatnið skal sigta þau eins og lýst er hér að framan og geyma saman, undir vatni (undir 6 – 10 cm vatnslagi), í myrkri við 4 ± 2 °C⁴ í 4 vikur að hámarki (7., 8. og 23. heimild). Sýni, sem nota á í rannsóknum við loftháð skilyrði, skulu geymd þar sem loft leikur um þau (t.d. í opnum ílátum) en sýni, sem eru ætluð til rannsókna við loftfirrð skilyrði, skulu geymd þar sem súrefni kemur hvergi nærri. Setið og vatnið mega ekki frjóska og setið má heldur ekki þorna meðan á flutningi og geymslu stendur.

1.8.4 Undirbúningur sets- og vatnssýna fyrir prófun

Sýnin skulu aðlöguð á tilteknu aðlögunartímabili áður en prófunarefninu er bætt við. Þá er hvert sýni sets og vatns sett í ræktunarílát sem nota á í aðalprófuninni og aðlögunin skal fara fram við nákvæmlega sömu skilyrði og ríkja við ræktunina í prófuninni (sjá lið 1.9.1). Aðlögunartímabilið stendur yfir í þann tíma sem þarf til að ná nægilegum stöðugleika í kerfinu að því er varðar sýrustig, súrefnisstyrk í vatni, oxunar-/afoxunarmátt setsins og vatnsins og stórsæjan aðskilnað á fösum. Aðlögunartímabilið skal að jafnaði standa yfir í eina til tvær vikur og skal ekki vera lengra en fjórar vikur. Skrá skal allar ákvarðanir frá þessu tímabili.

1.9 FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.9.1 Prófunarskilyrði

Prófunin skal fara fram í ræktunarbúnaðinum (sjá lið 1.8.1) þar sem hlutfall vatns og sets er á bilinu 3:1 og 4:1 og setlagið er $2,5 \pm 0,5$ cm ⁽⁴⁾. Mælt er með 50 g af seti að lágmarki (þurrvig) í hverju ræktunarkeri.

Prófunin skal fara fram í myrkri við stöðugt hitastig á bilinu 10 til 30 °C. Hitastigið 20 ± 2 °C er hæfilegt. Ef við á má í einstökum tilvikum bæta við prófun við enn lægri hita (t.d. 10 °C), eftir því hvaða upplýsingar stendur til að fá úr prófuninni. Fylgjast skal með hitastiginu í ræktuninni og skrá það.

1.9.2 Meðferð og ísetning prófunarefnis

Notaður er einn styrkur af prófunarefninu ⁽⁵⁾. Þegar plöntuvarnarefni eru sett beint í vatnshlot (water bodies) er notaður sá hámarksskammtur sem er tilgreindur á merkimiðanum, reiknaður út frá yfirborðsflatarmáli þess vatns sem er í prófunarilátinu. Í öllum öðrum tilvikum skal sá styrkur, sem er notaður, byggjast á spám varðandi losun út í umhverfið. Nauðsynlegt er að tryggja að styrkur prófunarefnisins, sem er notaður, nægi til að unnt verði að lýsa ummyndunarleiðinni og myndun og minnkun ummyndunarefnanna. Nauðsynlegt getur verið að nota stærri skammta (t.d. tífalda) við aðstæður þar sem styrkur prófunarefnisins er nærri greiningarmörkum við upphaf rannsóknarinnar og/ eða í tilvikum þar sem ekki er auðveldlega hægt að greina helstu ummyndunarefni ef styrkur þeirra er 10% af skammti prófunarefnisins. Ef meiri styrkur er notaður skal það ekki hafa veruleg, skaðleg áhrif á starfsemi örvera í vatns- og setkerfinu. Til að ná stöðugum styrk prófunarefnisins í kerjum af mismunandi stærð getur aðlögun að magni ísetningarefnisins verið heppileg og þá á grundvelli dýptar vatnssúlunnar í kerinu miðað við dýpt vatnsins í náttúrunni (sem telst vera 100 cm, en önnur dýpt getur einnig komið til greina). Sjá dæmi um útreikning í 4. viðauka.

Best er að prófunarefnið sé í vatnslausn þegar það er sett í vatnsfasa prófunarkerfisins. Ef ekki verður hjá því komist má nota litla skammta af vatnsleysanlegum leysum (s.s. aseton, etanol) við ísetningu og dreifingu prófunarefnisins en þeir ættu ekki að fara yfir 1% (miðað við rúmmál) og mega ekki hafa skaðleg áhrif á starfsemi örvera í prófunarkerfinu. Gæta skal varúðar þegar vatnslausn er búin til með prófunarefninu – heppilegt getur verið að nota sytursúlur (generator columns) og forblöndun til að tryggja fullkomna einsleitni. Þegar vatnslausninni hefur verið bætt í prófunarkerfið er mælt með vægri blöndun á vatnsfasanum þannig að svo lítil röskun verði á setinu sem framast er kostur.

Ekki er að jafnaði mælt með því að samsettar vörur séu notaðar þar eð innihaldsefni í samsetningunni geta haft áhrif á dreifingu prófunarefnisins og/ eða ummyndunarefnanna milli vatns- og setfasanna. Ef prófunarefnið er torleysanlegt í vatni getur þó verið heppilegt að nota samsett efni í staðinn.

Fjöldi ræktunarkerja fer eftir því hve oft sýni eru tekin (sjá lið 1.9.3). Svo mörg prófunarkerfi skulu vera í prófuninni að taka megir tvö kerfi úr notkun við hverja sýnatöku. Ef samanburðareiningar eru notaðar fyrir hvert vatnasetkerfi skulu þær ekki meðhöndlaðar með prófunarefninu. Nota má samanburðareiningarnar til að ákvarða lífmassa örveranna í setinu og heildarmagn lífræns kolefnis í vatninu og setinu við lok rannsóknarinnar. Nota má tvær samanburðareiningar (t.d. eina samanburðareiningu fyrir hvert vatnaset) til að fylgjast með þeim færiræyrum í seti og vatni sem óskað er á meðan aðlöggjafatímabilið stendur yfir (sjá töflu í lið 1.8.2.2). Bæta verður við tveimur samanburðareiningum til viðbótar ef prófunarefnið er sett í með leysi til að mæla skaðleg áhrif á starfsemi örvera í prófunarkerfinu.

1.9.3 Lengd prófunar og sýnataka

Tilraunin skal að jafnaði ekki standa lengur en í 100 daga (6. heimild) og skal halda henni áfram þar til niðurbrotsferli og dreifingarmynstur í vatni og seti hafa verið ákvörðuð eða þar til 90% af prófunarefninu hefur eyðst með ummyndun og/ eða uppgufun. Sýni skulu tekin í a.m.k. sex skipti (þ.m.t. á tímavörðunum) með eða án undanfarandi rannsókna, sem er valfrjáls (sjá lið 1.9.4) en er þá gerð til að ákveða heppilega sýnatökuáætlun og lengd prófunarinnar, nema nægileg gögn liggi fyrir um prófunarefnið úr fyrri rannsóknum.

⁽⁴⁾ Nýlegar rannsóknir hafa sýnt að geymsla við 4 °C getur valdið því að innihald lífræns kolefnis í seti minnkar og það getur hugsanlega leitt til minnkunar á starfsemi örvera (34. heimild).

⁽⁵⁾ Prófun með öðrum styrkleika til viðbótar getur verið gagnleg þegar um er að ræða iðefni sem berast í yfirborðsvatn eftir ýmsum leiðum (sem veldur þá talsverðum breytileika í styrk), að því tilskildu að unnt sé að greina minni styrkinn með nægri nákvæmni.

Þegar um er að ræða vatnsfælin prófunarefni getur verið nauðsynlegt að fjölga sýnatökutíðum til að geta ákvarðað dreifingarhlutfallið milli vatns- og setfasa.

Á viðeigandi sýnatökutímum eru ræktunarker í heild sinni (með samhliða sýnum) fjarlægð til greiningar. Set og vatn, sem er yfir því, eru greind hvort í sínu lagi ⁽⁶⁾. Fjarlægja skal yfirborðsvatnið varlega þannig að setið raskist sem minnst. Beita skal viðeigandi greiningaraðferðum við útdrátt og lýsingu á prófunarefninu og ummyndunarefnunum. Gæta skal þess að fjarlægja efni, sem gætu hafa ásgöngast við ræktunarkerið eða tengileiðslurnar sem eru notaðar til að fanga roksgjörn efni.

1.9.4 Valfrjáls forprófun

Ef ekki er unnt að ákvarða lengd prófunarinnar og sýnatökuáætlunina út frá öðrum viðeigandi rannsóknnum á prófunarefninu getur verið nauðsynlegt að gera valfrjálsa forprófun sem skal gerð við sömu prófunarskilyrði og þau sem nota á í endanlegri rannsókn. Ef forprófun er gerð skal gera stuttlega grein fyrir þeim tilraunaskilyrðum sem skipta máli og helstu niðurstöðum.

1.9.5 Mælingar og greining

Mæla skal styrk prófunarefnisins og ummyndunarefna í hvert sinn sem sýni eru tekin úr vatni og seti og skrá hann (sem styrk og sem hundraðshluta af ísettu magni). Almenna reglan er sú að greina skuli þau ummyndunarefni sem reynast hafa $\geq 10\%$ af þeirri geislavirkni sem er sett í heildarkerfi vatns og sets í hverju sýnatökutíðum nema gild rök séu færð fyrir því að gera það ekki. Einnig skal vega og meta hvort sanngreina skuli ummyndunarefni ef styrkur þeirra vex stöðugt meðan prófunin stendur, jafnvel þótt styrkur þeirra fari ekki yfir fyrrgreind mörk, þar eð það getur verið vísbending um þrávirkni þeirra. Þetta skal vegið og metið í hverju tilviki um sig og rökstutt í skýrslunni.

Skrá skal við hverja sýnatöku niðurstöður fyrir kerfi sem fanga lofttegundir/rokgjörn efni (CO₂ og fleiri, þ.e. rokgjörn, lifræn efnasambönd). Skrá skal sundrunarhraðann. Skrá skal óútdraganlegar (bundnar) leifar í seti í hvert sinn sem sýni eru tekin.

2. GÖGN

2.1 ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Reikna skal út heildarmassajafnvægi eða endurheimt (sjá lið 1.7.1) fyrir viðbætta geislavirkni í hvert sinn sem sýni eru tekin. Niðurstöður skulu skráðar sem hundraðshlutar af viðbættri geislavirkni. Skrá skal dreifingu geislavirkni í vatni og seti sem styrk og hundraðshluta í hvert sinn sem sýni eru tekin.

Reikna skal úr helmingunartíma prófunarefnisins, DT₅₀, og, ef við á, DT₇₅ og DT₉₀ ásamt öryggismörkum (sjá lið 1.7.3). Upplýsinga um það hversu hratt prófunarefnið eyðist úr vatni og seti má afla með viðeigandi matsaðferðum. Þær geta verið fólgnar í beitingu hraðafræði af sýndarfyrstu gráðu, ferilnálgunum, sem eru byggðar á reynslu þar sem myndrænum eða tölulegum lausnum er beitt, og flóknara mati þar sem ferillinn er t.d. nálgadur í einu lagi eða í bótum (eins hólfis eða margra hólfra líkön (single or multi-compartment models)). Frekari upplýsingar má finna í 35., 36. og 37. heimild.

Allar aðferðir hafa sína kosti og galla og eru mjög misflóknar. Sé gengið út frá hraðafræði af fyrstu gráðu getur það verið of mikil einföldun á niðurbrots- og dreifingarferlunum en þegar það er raunhæft fást hugtök (hraðafasti eða helmingunartími) sem eru auðskilin og nýtast við gerð hermílikana og útreikninga á áætluðum umhverfisstyrk. Aðferðir, byggðar á athugunum, eða línuleg ummyndun getur gefið betri aðlögun ferla að gögnum og því verður auðveldara að áætla helmingunartíma, DT₅₀ og, ef við á, gildi fyrir DT₇₅ og DT₉₀. Afleiðdir fastar hafa þó takmarkað notagildi. Með hólfalíkönnum (compartment models) geta fengist margir gagnlegir fastar sem hafa þýðingu við áhættumat og lýsa niðurbrotshraða í mismunandi hólfum og dreifingu iðefnisins.

⁽⁶⁾ Í tilvikum þar sem ummyndunarefni, sem myndast við loftfirrð skilyrði, geta enduroxast hratt skal loftfirrðum skilyrðum viðhaldið meðan á sýnatöku og greiningu stendur.

Einnig ætti að nota þau til að áætla hraðafasta í tengslum við myndun og niðurbrot helstu ummyndunarefna. Í hverju tilviki þarf að færa rök fyrir vali á viðkomandi aðferð og sýna skal fram á mátgæði hennar, myndrænt og/eða tölfræðilega.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1 PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

- almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla (þ.m.t. staðsetning merkis eða merkja ef geislamerkt efni eru notuð) og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli,
- hreinleiki (óhreinindi) prófunarefnis,
- geislaefnafræðilegur hreinleiki merktra íðefna og mólsvirkni (ef við á).

Viðmiðunarefni:

- efnaheiti og bygging viðmiðunarefnisins sem er notað til lýsingar og/eða sanngreiningar á ummyndunarefnum.

Prófunarset og -vatn:

- staðsetning og lýsing á stað eða -stöðum þar sem sýni eru tekin úr vatnaseti, þ.m.t. saga mengunar ef unnt er,
- allar upplýsingar um töku, geymslu (ef um hana er að ræða) og aðlögun vatns- og setkerfa,
- eiginleikar vatns- og setsýna eins og tilgreint er í töflunni í lið 1.8.2.2.

Prófunarskilyrði:

- prófunarkerfið sem er notað (t.d. gegnumstreymi, lífmælingar (biometer), loftunaraðferð, aðferð við blöndun, vatnsmagn, massi sets, þykkt bæði vatns- og setlags, stærðarmál prófunarkerja o.s.frv.),
- ísetningprófunarefnis í prófunarkerfið: prófunarstyrkur, fjöldi samhliða sýna og samanburðarsýna, aðferð við ísetningu prófunarefnis (t.d. notkun leysis ef um hann er að ræða) o.s.frv.,
- ræktunarhiti,
- sýnatökutímar,
- útdráttaraðferðir og skilsvirkni, svo og greiningaraðferðir og greiningarmörk,
- aðferðir við lýsingu/sanngreiningu á ummyndunarefnum,
- frávík frá aðferðarlýsingu prófunar eða prófunarskilyrðum í rannsókninni.

Niðurstöður:

- óunnin gögn (töluleg gildi) um dæmigerðar greiningar (öll óunnin gögn skulu skjöluð samkvæmt reglum um góðar starfsvenjur við rannsóknir),
- endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðanna sem eru notaðar,
- endurheimtarhlutföll (gildi í % fyrir gilda rannsókn eru gefin upp í lið 1.7.1),
- töflur með niðurstöðum, sem gefnar eru upp sem hundraðshlutar af notuðum skammti og sem $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ í vatni, seti og heildarkerfi (aðeins í %) fyrir prófunarefnið og, ef við á, fyrir ummyndunarefni og óútdraganlega geislavirkni,

- massajafnvægi í rannsóknunum og við lok þeirra,
- myndræn framsetning á ummyndun í vatni, seti og í heildarkerfinu (þ.m.t. sundrun),
- sundrunarhraði (mineralisation),
- helmingunartími prófunarefnisins, DT_{50} , og, ef við á, DT_{75} og DT_{90} og, eftir því sem við á, helstu ummyndunarefna, þ.m.t. öryggismörk í vatni, seti og í heildarkerfinu,
- mat á ummyndunarhraða prófunarefnisins og, ef við á, helstu ummyndunarefna,
- líkleg ummyndunarferli, eftir því sem við á,
- umræða um niðurstöður.

4

HEIMILDASKRÁ

- 1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). IV. hluti, liður 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Þýskaland.
- 2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). G-hluti. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, liður G.2.1 (a). Holland.
- 3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. Breska konungsríkið.
- 4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Kanada. bls. 35–37.
- 5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). liður 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- 6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ritstj. dr. Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- 7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Ítalía, 18.–20. janúar 1995.
- 8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling - 12. hluti: Guidance on sampling of bottom sediments.
- 9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- 10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- 11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).
- 12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (samþykkt 12. maí 1981).
- 13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. París. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. og Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.
- 15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. Í „Progress in Pesticide Biochemistry“ (D.H. Hutson, T.R. Roberts, ritstj.), 1. bindi, 85–114. J. Wiley & Sons.

- 16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631–637.
- 17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C -labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661–667.
- 18) Black, C.A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- 19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17. útg.). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- 20) Rowell, D.L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
- 21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, 1038–1039.
- 22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. Frá vinnufundinum „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3.–4. júlí 1991.
- 23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. Frá vinnufundinum „On Sediment Toxicity Assessment“ (WOSTA), 8.–10. nóvember 1993. Ritstj.: I.R. Hill, P. Matthiessen og F. Heimbach.
- 24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858–2868.
- 25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329–338.
- 26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197–203.
- 27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – 2. hluti: Fumigation-extraction method.
- 28) Beelen, P. Van og F. Van Keulen. (1990). The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13–21.
- 29) Shelton, D.R. og Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850–857.
- 30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. og Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527–1550.
- 31) Pagga, U. og Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499–1509.
- 32) Nuck, B.A. og Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597–3603.
- 33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- 34) Sijm, Haller og Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961–968.
- 35) Timme, G., Frehse H. og Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187–203.
- 36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47–60.
- 37) Carlton, R.R. og Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, bls. 1349–1354.

*I. VIÐAUKI***LEIÐBEININGAR UM LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ PRÓFUNARKERFI****Loftháð prófunarkerfi**

Loftháða prófunarkerfið, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er gert úr vatnslagi við loftháð skilyrði (dæmigerður súrefnisstyrkur er $7 - 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) og setlagi þar sem skilyrði eru loftháð við yfirborðið en loftfirrð undir yfirborðinu (dæmigerður oxunar-/afoxunarmáttur (E_h) í loftháða hluta setsins er til jafnaðar -80 til -190 mV). Rakabætt loft er látið leika um yfirborð vatnsins í hverri ræktunareiningu til að halda nægu súrefni í kollrúminu.

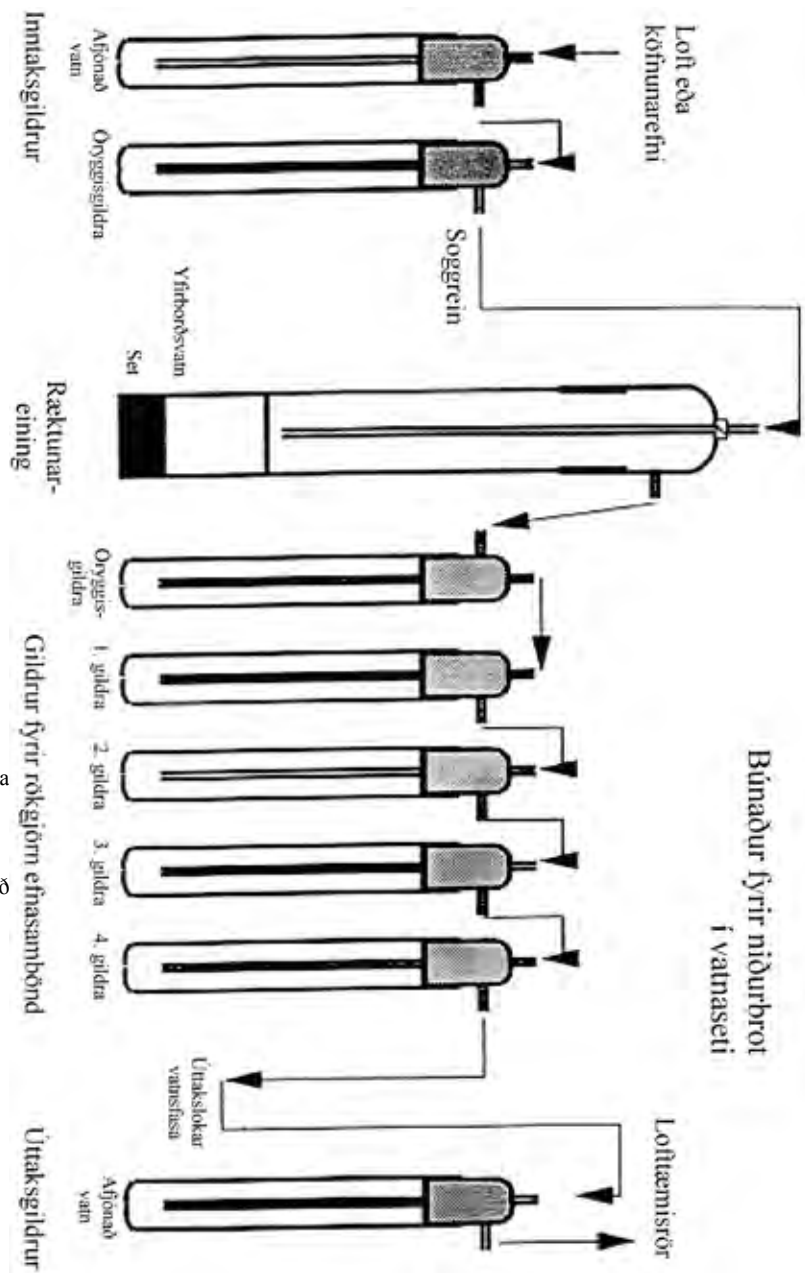
Loftfirrð prófunarkerfi

Í loftfirrðu prófunarkerfi er prófunaraðferðin í meginatriðum sú sama og í loftháðu kerfi með þeirri undantekningu að rakabætt köfnunarefni er látið leika um yfirborð vatnsins í hverri ræktunareiningu til að halda kollrúminu köfnunarefnisfylltu. Setið og vatnið teljast vera við loftfirrð skilyrði ef oxunar-/afoxunarmátturinn (E_h) er lægri en -100 mV .

Í loftfirrðri prófun felur mat á sundrun í sér mælingu á þeim koltvísýringi og því metani sem myndast.

2. VIÐAUKI

DÆMI UM GASGEGNUMSTREYMISBÚNAÐ



Öryggisgildra, tóm

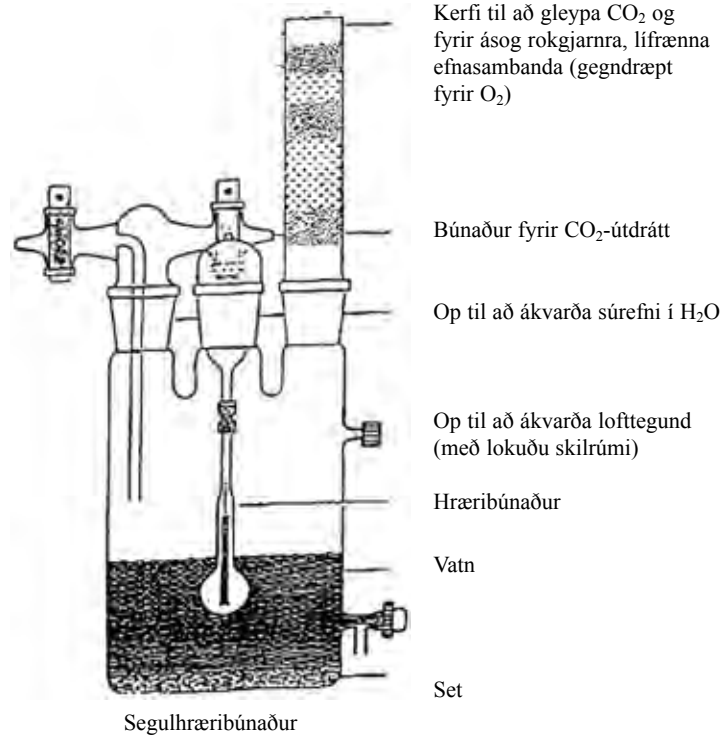
1. gildra:
etýlenglýkól til að fanga
rokkgjörn, lífræn efni

2. gildra:
0,1 M brennisteinssýra til að
fanga basísk, rokkgjörn efni

3. og 4. gildra:
2 M natríumhýdroxíð til að
fanga CO₂ og önnur súr,
rokkgjörn efni

3. VIÐAUKI

DÆMI UM LÍFMÆLINGABÚNAÐ (BIOMETER APPARATUS)



*4. VIÐAUKI***DÆMI UM ÚTREIKNING Á SKAMMTI SEM ER SETTUR Í PRÓFUNARKER**

Innanmál mæliglass:	= 8 cm
Dýpt vatnssúlu, án sets:	= 12 cm
Yfirborðsflatarmál $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Skömmun: 500 g af prófunarefni/ha svara til 5 µg/cm ²	
Alls í µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Magnið leiðrétt svo að það samsvari 100 cm dýpt: $12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Rúmmál vatnssúlu: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Styrkur í vatni: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml or 50 µg/l
