ÍSLENSK útgáfa

EES-viðbætir

við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins

ISSN 1022-9337

Nr. 74

24. árgangur

16.11.2017

I EES-STOFNANIR

1. Sameiginlega EES-nefndin

2017/EES/74/01 Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar frá 24. apríl 2013 um breytingu á framkvæmdarákvörðun 2012/715/ESB um skrá yfir þriðju lönd með regluramma sem gildir um virk efni í mannalyf og tilheyrandi starfsemi á sviði eftirlits og framfylgdar sem tryggir lýðheilsuvernd sem er jafngild þeirri sem er við lýði í Sambandinu (2013/196/ESB) 1

2017/EES/74/02 Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/191 frá 1. febrúar 2017 um breytingu á ákvörðun 2010/166/ESB í því skyni að innleiða nýja tækni og tíðnisvið fyrir farsímafjarskiptaþjónustu um borð í skipum (MCV-þjónustu) í Evrópusambandinu 3

2017/EES/74/03 Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1145 frá 8. júní 2017 um töku tiltekinna fóðuraukefna af markaði, sem voru heimiluð samkvæmt tilskipunum ráðsins 70/524/EBE og 82/471/EBE, og um niðurfellingu á úreltum ákvæðum sem heimila þessi fóðuraukefni 9

2017/EES/74/04 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1432 frá 7. ágúst 2017 um breytingu á reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 um setningu plöntuverndarvara á markað að því er varðar viðmiðanir fyrir samþykki fyrir áhættulitlum virkum efnum 31

2017/EES/74/05 Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/855 frá 18. maí 2017 um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 að því er varðar skilyrði fyrir samþykki fyrir virka efninu díflúbensúróni 35

2017/EES/74/06 Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/856 frá 18. maí 2017 um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 að því er varðar skilyrði fyrir samþykki fyrir virka efninu flúroxýpýri 39

2017/EES/74/07 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1224 frá 6. júlí 2017 um breytingu á V. viðauka við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1223/2009 um snyrtivörur ... 42

2017/EES/74/08 Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/254 frá 30. nóvember 2016 um breytingu á framseldu reglugerðunum (ESB) nr. 1059/2010, (ESB) nr. 1060/2010, (ESB) nr. 1061/2010, (ESB) nr. 1062/2010, (ESB) nr. 626/2011, (ESB) nr. 392/2012, (ESB) nr. 874/2012, (ESB) nr. 665/2013, (ESB) nr. 811/2013, (ESB) nr. 812/2013, (ESB) nr. 65/2014, (ESB) nr. 1254/2014, (ESB) 2015/1094, (ESB) 2015/1186 og (ESB) 2015/1187 að því er varðar beitingu vikmarka í sannprófunaraðferðum 45

2017/EES/74/09 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/2282 frá 30. nóvember 2016 um breytingu á reglugerðum (EB) nr. 1275/2008, (EB) nr. 107/2009, (EB) nr. 278/2009, (EB) nr. 640/2009, (EB) nr. 641/2009, (EB) nr. 642/2009, (EB) nr. 643/2009, (ESB) nr. 1015/2010, (ESB) nr. 1016/2010, (ESB) nr. 327/2011, (ESB) nr. 206/2012, (ESB) nr. 547/2012, (ESB) nr. 932/2012, (ESB) nr. 617/2013, (ESB) nr. 666/2013, (ESB) nr. 813/2013, (ESB) nr. 814/2013, (ESB) nr. 66/2014, (ESB) nr. 548/2014, (ESB) nr. 1253/2014, (ESB) 2015/1095, (ESB) 2015/1185, (ESB) 2015/1188, (ESB) 2015/1189 og (ESB) 2016/2281 að því er varðar beitingu vikmarka í sannprófunaraðferðum 80

2017/EES/74/10 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/363 frá 1. mars 2017 um breytingu á reglugerð (ESB) nr. 965/2012 að því er varðar sérstakt samþykki fyrir starfrækslu eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli að næturlagi eða við blindflugsskilyrði og að því er varðar samþykkiskröfur fyrir þjálfun vegna hættulegs varnings fyrir sérstaka starfrækslu í ábataskyni, starfrækslu flókinna, vélknúinna loftfara, sem er ekki í ábataskyni, og sérstaka starfrækslu flókinna, vélknúinna loftfara sem er ekki í ábataskyni 140

2017/EES/74/11 Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/386 frá 6. mars 2017 um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 1207/2011 um kröfur um afköst og rekstrarsamhæfi kögunar í samevrópska loftrýminu 149

2017/EES/74/12 Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/748 frá 14. desember 2016 um breytingu á I. viðauka við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 510/2011 til að taka tillit til þróunar á massa nýrra léttra atvinnuökutækja sem skráð voru 2013, 2014 og 2015 152

2017/EES/74/13 Reglugerð ráðsins (ESB) 2017/997 frá 8. júní 2017 um breytingu á III. viðauka við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/98/EB að því er varðar hættuflokkinn HP 14 „visteitraður“ 154

2017/EES/74/14 Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/996 frá 19. maí 2015 um að koma á sameiginlegum matsaðferðum fyrir hávaða samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/49/EB 158

2017/EES/74/15 Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/735 frá 14. febrúar 2017 um breytingu á viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni, í því skyni að laga hann að tækniframförum (efnareglurnar (REACH)) 162

2017/EES/74/16 Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/1412 frá 1. ágúst 2017 um viðurkenningu á Fiji samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/106/EB að því er varðar kerfi fyrir þjálfun og útgáfu skírteina farmanna 564

2017/EES/74/17 Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2017/815 frá 12. maí 2017 um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 að því er varðar nánari útlistun, samræmingu og einföldun á tilteknum flugverndarráðstöfunum 566

2017/EES/74/18 Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/2072 frá 22. september 2016 um sannprófunarstörf og faggildingu sannprófenda samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum 634

2017/EES/74/19 Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1927 frá 4. nóvember 2016 um sniðmát fyrir vöktunaráætlanir, losunarskýrslur og samræmingarskjöl samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum 654

II EFTA-STOFNANIR

1. Fastanefnd EFTA-ríkjanna

2. Eftirlitsstofnun EFTA

3. EFTA-dómstóllinn

III ESB-STOFNANIR

1. Framkvæmdastjórnin

EES-STOFNANIR

SAMEIGINLEGA EES-NEFNDIN

FRAMKVÆMDARÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 2017/EES/74/01

frá 24. apríl 2013

um breytingu á framkvæmdarákvörðun 2012/715/ESB um skrá yfir þriðju lönd með regluramma sem gildir um virk efni í mannalyf og tilheyrandi starfsemi á sviði eftirlits og framfylgdar sem tryggir lýðheilsuvernd sem er jafngild þeirri sem er við lýði í Sambandinu

(2013/196/ESB) (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2001/83/EB frá 6. nóvember 2001 um Bandalagsreglur um lyf sem ætluð eru mönnum ([1]), einkum 1. mgr. 111. gr. b,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Þriðja landi er heimilt að óska eftir því við framkvæmdastjórnina, í samræmi við 1. mgr. 111. gr. b í tilskipun 2001/83/EB, að hún meti hvort reglurammi þess lands fyrir virk efni, sem eru flutt út til Sambandsins, og tilheyrandi starfsemi á sviði eftirlits og framfylgdar tryggi lýðheilsuvernd sem er jafngild þeirri sem er við lýði í Sambandinu, í því skyni að vera fært á skrá yfir þriðju lönd sem tryggja jafngilda lýðheilsuvernd.

2) Í bréfi, dagsettu 18. september 2012, óskaði Ástralía eftir að vera færð á skrá í samræmi við 1. mgr. 111. gr. b í tilskipun 2001/83/EB. Jafngildismat framkvæmdastjórnarinnar staðfesti að kröfunum í þeirri grein væri fullnægt. Við framkvæmd jafngildismatsins var tekið tillit til samningsins um gagnkvæma viðurkenningu ([2]) milli Ástralíu og Sambandsins, eins og um getur í 2. mgr. 51. gr. þeirrar tilskipunar.

3) Breyta ætti framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2012/715/ESB frá 22. nóvember 2012 um skrá yfir þriðju lönd með regluramma sem gildir um virk efni í mannalyf og tilheyrandi starfsemi á sviði eftirlits og framfylgdar sem tryggir lýðheilsuvernd sem er jafngild þeirri sem er við lýði í Sambandinu, í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2001/83/EB ([3]) til samræmis við það.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Í stað viðaukans við framkvæmdarákvörðun 2012/715/ESB komi viðaukinn við þessa ákvörðun.

2. gr.

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

Gjört í Brussel 24. apríl 2013.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

José Manuel BARROSO

forseti.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 113, 25.4.2013, bls. 22. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 82/2017 frá 16. maí 2014 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. EB L 311, 28.11.2001, bls. 67.

([2]) Stjtíð. EB L 229, 17.8.1998, bls. 3.

([3]) Stjtíð. ESB L 325, 23.11.2012, bls. 15.

VIÐAUKI

„VIÐAUKI

Þriðja land	Athugasemdir
Ástralía	
Sviss“	

FRAMKVÆMDARÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/191 **2017/EES/74/02**

frá 1. febrúar 2017

um breytingu á ákvörðun 2010/166/ESB í því skyni að innleiða nýja tækni og tíðnisvið fyrir farsímafjarskiptaþjónustu um borð í skipum (MCV-þjónustu) í Evrópusambandinu

(tilkynnt með númeri C(2017) 450 (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af ákvörðun Evrópuþingsins og ráðsins nr. 676/2002/EB frá 7. mars 2002 um regluramma um stefnu Evrópubandalagsins varðandi tíðniróf fyrir þráðlausar sendingar (ákvörðun um tíðniróf fyrir þráðlausar sendingar), ([1]), einkum 3. mgr. 4. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2010/166/ESB ([2]) eru sett tæknileg og rekstrarleg skilyrði sem nauðsynleg eru til að hægt sé að nota GSM-kerfi um borð í skipum (MCV-þjónustu) í Sambandinu.

2) Þróun bættra samskiptaaðferða, sem studdar eru af tækniframförum, getur aukið getu allra borgara til að vera tengdir alls staðar og alltaf, í samræmi við stefnuáætlunina til margra ára varðandi fjarskiptatíðnirófs, sem komið var á fót með ákvörðun Evrópuþingsins og ráðsins nr. 243/2012/ESB ([3]), og lagt sitt af mörkum til framkvæmdar á stafræna innri markaðnum. Enn fremur ætti að nota tíðniróf í samræmi við meginreglur um tækni- og þjónustuhlutleysi sem settar eru fram í tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/21/EB ([4]).

3) Í ákvörðun 2010/166/ESB eru aðildarríkin hvött til að fylgjast með notkun kerfa, sem veita MCV-þjónustu á 900 MHz og 1 800 MHz tíðniböndunum, innan sinnar landhelgi, einkum með tilliti til áframhaldandi mikilvægis allra skilyrðanna í þeirri ákvörðun og til tilvika um skaðlegar truflanir. Einnig er þess krafist að aðildarríkin leggi fyrir framkvæmdastjórnina skýrslu um niðurstöður sínar og framkvæmdastjórnin ætti, eftir því sem við á, að endurskoða ákvörðun 2010/166/ESB.

4) Skýrslur, sem aðildarríkin hafa lagt fyrir framkvæmdastjórnina, hafa staðfest, svo ekki verður um villst, að nauðsynlegt er að heimila nýja fjarskiptatækni til notkunar fyrir MCV-þjónustu.

5) Til að greiða fyrir frekari útbreiðslu á notkun MCV-tækni innan Sambandsins veitti framkvæmdastjórnin Samtökum póst- og fjarskiptastjórna í Evrópu (CEPT) umboð, 16. nóvember 2015, í samræmi við 2. mgr. 4. gr. ákvörðunar nr. 676/2002/EB, til að athuga hvort búnaður á hafi úti, sem notar LTE-tækni, geti starfað samhliða rafrænum fjarskiptakerfum í landi, sem starfa á 1 710-1 785/1 805-1 880 MHz og 2 500-2 570/2 620-2 690 MHz tíðniböndunum, og hvort búnaður á hafi úti, sem notar UMTS-tækni, geti starfað samhliða rafrænum fjarskiptakerfum í landi sem starfa á 1 920-1 980/2 110-2 170 MHz tíðnisviðunum.

6) Í kjölfar umboðsins samþykktu Samtök póst- og fjarskiptastjórna í Evrópu, 17. júní 2016, skýrslu sína nr. 62 þar sem niðurstaðan var sú að það væri mögulegt að starfrækja MCV-þjónustu, að því tilskildu að viðeigandi tæknileg skilyrði væru uppfyllt, með því að nota LTE-tækni á 1 710-1 785/1 805-1 880 MHz og 2 500-2 570/2 620-2 690 MHz tíðniböndunum og með því að nota UMTS-tækni á 1 920-1 980/2 110-2 170 MHz tíðnibandinu. Því ætti að breyta ákvörðun 2010/166/ESB, á grunni niðurstaðnanna úr CEPT-skýrslu nr. 62, svo hún taki til þessarar tækni og tíðnisviða og til að heimila notkun á kerfum, sem byggjast á þessari tækni, um borð í skipum.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 29, 3.2.2017, bls. 63. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 183/2017 frá 22. september 2017 um breytingu á XI. viðauka (Rafræn fjarskipti, hljóð- og myndmiðlun og upplýsingasamfélagið) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. EB L 108, 24.4.2002, bls. 1.

([2]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2010/166/ESB frá 19. mars 2010 um samræmd skilyrði fyrir notkun tíðnirófs fyrir þráðlausar sendingar til farsímafjarskipta um borð í skipum (MCV-þjónusta) í Evrópusambandinu (Stjtíð. ESB L 72, 20.3.2010, bls. 38).

([3]) Ákvörðun Evrópuþingsins og ráðsins nr. 243/2012/ESB frá 14. mars 2012 um að koma á stefnuáætlun til margra ára varðandi fjarskiptatíðniróf (Stjtíð. ESB L 81, 21.3.2012, bls. 7).

([4]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/21/EB frá 7. mars 2002 um sameiginlegan regluramma um rafræn fjarskiptanet og -þjónustu (rammatilskipun) (Stjtíð. EB L 108, 24.4.2002, bls. 33).

7) Með fyrirvara um kröfurnar, sem settar eru fram í viðaukanum, og til að vernda aðra heimilaða notkun á tíðnirófi er aðildarríkjunum heimilt að setja landfræðilegar viðbótartakmarkanir á notkun MCV-kerfisins innan sinnar landhelgi.

8) Að teknu tilliti til mikilvægis UMTS- og LTE-tækninnar fyrir þráðlaus fjarskipti innan Sambandsins ætti möguleikinn á að nota MCV LTE-kerfi og MCV UMTS-kerfi, eins og lýst er í þessari ákvörðun, að öðlast gildi eins fljótt og auðið er og eigi síðar en sex mánuðum eftir tilkynningardag þessarar ákvörðunar.

9) Halda ætti áfram að fylgjast með MCA-tækniforskriftum í því skyni að tryggja að þær haldist í hendur við tækniframfarir.

10) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari ákvörðun, eru í samræmi við álit nefndarinnar um fjarskiptatíðniróf.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Ákvörðun 2010/166/ESB er breytt sem hér segir:

1. Í stað 1. gr. komi eftirfarandi:

„1. gr.

„Tilgangurinn með þessari ákvörðun er að samræma tæknilegu skilyrðin um framboð og skilvirka notkun á 900 MHz, 1 800 MHz, 1 900/2 100 MHz og 2 600 MHz tíðniböndunum fyrir kerfi farsímafjarskipta um borð í skipum innan landhelginnar í Sambandinu.“

2. Ákvæðum 2. gr. er breytt sem hér segir:

a) Í stað 1. liðar komi eftirfarandi:

„1. „farsímafjarskiptaþjónusta um borð í skipum (MCV-þjónusta)“: rafræn fjarskiptaþjónusta, eins og hún er skilgreind í c-lið 2. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins (*) 2002/21/EB, sem fyrirtæki veitir til að einstaklingar um borð í skipi geti haft samskipti í gegnum almenn fjarskiptanet með því að nota kerfi, sem fellur undir 3. gr., án þess að koma á beinu sambandi við farnet í landi,

_____

(*) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/21/EB frá 7. mars 2002 um sameiginlegan regluramma um rafræn fjarskiptanet og -þjónustu (rammatilskipun) (Stjtíð. EB L 108, 24.4.2002, bls. 33).“

b) Í stað 7. liðar komi eftirfarandi:

„7. „móðurstöð sendiviðtækis um borð í skipi“: píkósella (e. *pico-cell*) sem er staðsett um borð í skipi og styður GSM-, LTE- eða UMTS-þjónustu í samræmi við viðaukann við þessa ákvörðun,“.

c) Eftirfarandi liðir bætist við:

„8. „1 900/2 100 MHz tíðniböndin“: 1 920/1 980 MHz tíðnibandið fyrir útgreinina (endabúnaður sendir, móðurstöð tekur við) og 2 110-2 170 MHz tíðnibandið fyrir aðgreinina (móðurstöð sendir, endabúnaður tekur við),

9. „2600 MHz tíðnibandið“: 2 500-2 570 MHz tíðnibandið fyrir útgreinina (endabúnaður sendir, móðurstöð tekur við) og 2 620-2 690 MHz tíðnibandið fyrir aðgreinina (móðurstöð sendir, endabúnaður tekur við),

10. „LTE-kerfi“: rafrænt fjarskiptanet eins og það er skilgreint í viðaukanum við framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2011/251/ESB (*),

11. „UMTS-kerfi“: rafrænt fjarskiptanet eins og það er skilgreint í viðaukanum við framkvæmdarákvörðunina 2011/251/ESB.

(*) Framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2011/251/ESB frá 18. apríl 2011 um breytingu á ákvörðun 2009/766/EB um samræmingu á tíðnisviðunum 900 MHz og 1800 MHz fyrir landstöðvakerfi sem eru fær um að veita samevrópska, rafræna fjarskiptaþjónustu innan Bandalagsins (Stjtíð. ESB L 106, 27.4.2011, bls. 9).“

3. Í stað 3. gr. komi eftirfarandi:

„3. gr.

1. Aðildarríkin skulu a.m.k. gera 2 MHz af tíðnirófinu aðgengilegt fyrir útgreinina og 2 MHz af samsvarandi samtengdu tíðnirófi fyrir aðgreinina innan 900 og/eða 1 800 MHz tíðnibandanna fyrir GSM-kerfi sem veita MCV-þjónustu án truflana og óvarið innan landhelgi þeirra.

2. Aðildarríkin skulu, eins fljótt og auðið er og sex mánuðum eftir tilkynningardag þessarar ákvörðunar, gera 5 MHz af tíðnirófinu aðgengilegt fyrir útgreinina og 5 MHz af samsvarandi samtengdu tíðnirófi fyrir aðgreinina innan 1 900/2 100 MHz tíðnibandanna fyrir UMTS-kerfi og innan 1 800 og 2 600 MHz tíðnibandanna fyrir LTE-kerfi sem veita MCV-þjónustu án truflana og óvarið innan landhelgi þeirra.

3. Aðildarríkin skulu sjá til þess að kerfin, sem falla undir 1. og 2. mgr., uppfylli skilyrðin sem sett eru fram í viðaukanum.“

4. Í stað 4. gr. komi eftirfarandi:

„4. gr.

Aðildarríkin skulu fylgjast með notkun kerfanna, sem um getur í 1. og 2. mgr. 3. gr., sem veita MCV-þjónustu innan landhelgi þeirra, á tíðniböndunum, einkum með tilliti til áframhaldandi mikilvægis allra skilyrðanna, sem sett eru fram í 3. gr., og til tilvika um skaðlegar truflanir.“

5. Viðaukinn við þessa ákvörðun kemur í stað viðaukans.

2. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 1. febrúar 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Andrus ANSIP

varaforseti.

VIÐAUKI

„VIÐAUKI

Skilyrði sem kerfi sem veitir MCV-þjónustu í landhelgi aðildarríkja Evrópusambandsins á að uppfylla til að forðast skaðlegar truflanir fyrir farnet í landi

1) Skilyrði sem GSM-kerfi sem starfa á 900 MHz tíðnibandinu og 1 800 MHz tíðnibandinu og veita MCV-þjónustu í landhelgi aðildarríkja Evrópusambandsins eiga að uppfylla til að forðast skaðlegar truflanir fyrir farnet í landi.

Eftirtalin skilyrði skulu gilda:

a) kerfið sem veitir MCV-þjónustuna skal ekki notað nær grunnlínunni, eins og hún er skilgreind í hafréttarsamningi Sameinuðu þjóðanna, en sem nemur tveimur sjómílum ([1]),

b) einungis skal nota eitt eða fleiri inniloftnet móðurstöðvar sendiviðtækis um borð í skipi sem er staðsett 2–12 sjómílur frá grunnlínunni,

c) mörk sem á að setja fyrir endabúnað farnets þegar hann er notaður um borð í skipi og fyrir móðurstöð sendiviðtækis í skipi:

Mæliþáttur	Lýsing
Afl sendingar/aflþéttni	Að því er varðar endabúnað farneta, sem er notaður um borð í skipum og stjórnað af móðurstöð sendiviðtækis í skipi á 900 MHz tíðnibandinu, skal mesta útgeislun frálags vera003A 5 dBm
	Að því er varðar endabúnað farneta, sem er notaður um borð í skipum og stjórnað af móðurstöð sendiviðtækis í skipi á 1 800 MHz tíðnibandinu, skal mesta útgeislun frálags vera: 0 dBm
	Fyrir móðurstöðvar um borð í skipum skal mesta aflþéttni, sem mælist utandyra í skipinu, vera, með vísun til 0 dBi-mælingar á loftnetsmögnun: – 80 dBm/200 kHz
Reglur um aðgang að rásum og notkun þeirra	Nota skal tækni til að milda truflanir sem veitir a.m.k. jafngilda frammistöðu og eftirfarandi mildandi þættir sem byggjast á GSM-stöðlum: — á bilinu 2–3 sjómílur frá grunnlínunni skulu næmi viðtækisins og viðmiðunarmörk aftengingar (ACCMIN-stig ([1]) og lágmarks- RXLEV ([2])) endabúnaðs farnetsins, sem er notaður um borð í skipi, vera jafn og eða hærri en – 70 dBm/200 kHz og 3–12 sjómílur frá grunnlínunni skal hann vera jafn og eða hærri en – 75 dBm/200 kHz, — slitrótt sending ([3]) skal virkjuð í útgreinarátt MCV-kerfisins, — gildi framflutnings tímastillingar ([4]) fyrir móðurstöð sendiviðtækis um borð í skipi skal stillt eins lágt og unnt er.

([1]) ACCMIN (RX_LEV_ACCESS_MIN), eins og lýst er í GSM-staðli ETSI TS 144 018.
([2]) RXLEV (RXLEV-FULL-SERVING-CELL), eins og er lýst í GSM-staðli ETSI TS 148 008.
([3]) Slitrótt sending, eða DTX, eins og lýst er í GSM-staðli ETSI TS 148 008.
([4]) Framflutningur tímastillingar, eins og lýst er í GSM-staðli ETSI TS 144 018.

2) Skilyrði sem UMTS-kerfi, sem starfa á 1 900/2 100 MHz tíðniböndunum og veita MCV-þjónustu innan landhelgi aðildarríkja Evrópusambandsins, þurfa að uppfylla til að forðast skaðlegar truflanir fyrir farnet í landi.

Eftirtalin skilyrði skulu gilda:

a) kerfið sem veitir MCV-þjónustuna skal ekki notað nær grunnlínunni, eins og hún er skilgreind í hafréttarsamningi Sameinuðu þjóðanna, en sem nemur tveimur sjómílum,

([1]) Ein sjómíla = 1 852 metrar

b) einungis skal nota eitt eða fleiri inniloftnet móðurstöðvar sendiviðtækis um borð í skipi sem er staðsett 2–12 sjómílur frá grunnlínunni,

c) einungis má nota bandbreidd upp að 5 MHz (tvívirka),

d) mörk sem á að setja fyrir endabúnað farnets þegar hann er notaður um borð í skipi og fyrir móðurstöð sendiviðtækis í skipi:

Mæliþáttur	Lýsing
Afl sendingar/aflþéttni	Að því er varðar endabúnað farnets, sem sendir út á 1 900 MHz tíðnibandinu, sem er notaður um borð í skipum og stjórnað af móðurstöð sendiviðtækis í skipi á 2 100 MHz tíðnibandinu, skal mesta útgeislun frálags vera: 0 dBm/5 MHz
Útgeislun á þilfari	Útgeislun á þilfari frá móðurstöð sendiviðtækis um borð í skipi skal vera jöfn og eða minni en – 102 dBm/5 MHz (almenn rás fyrir hafnsögumann)
Reglur um aðgang að rásum og notkun þeirra	Á bilinu 2–12 sjómílur frá grunnlínunni skal gæðaviðmiðunin (lágmarkskrafa um styrk móttekins merkis í píkósellunni) vera jöfn og eða hærri en: – 87 dBm/5 MHz
	Tímastillirinn fyrir val á opinberu farneti í landi skal stilltur á 10 mínútur.
	Mæliþáttur fyrir framflutning tímastillingar skal stilltur samkvæmt sviði píkósellunnar fyrir MCV-dreifiloftnetskerfis sem samsvarar 600 m
	Sleppitímamælir RRC-samskiptareglnanna fyrir aðgerðaleysi notanda skal stilltur á tvær sekúndur
Ekki samstilling við netkerfi í landi	Miðjutíðni MCV-burðarbylgjunnar skal ekki vera samstillt við burðarbylgjur netkerfa í landi.

3) Skilyrði sem LTE-kerfi, sem starfa á 1 800 MHz tíðnibandinu og 2 600 MHz tíðnibandinu og veita MCV-þjónustu innan landhelgi aðildarríkja Evrópusambandsins, þurfa að uppfylla til að forðast skaðlegar truflanir fyrir farnet í landi

Eftirtalin skilyrði skulu gilda:

a) kerfið sem veitir MCV-þjónustuna skal ekki notað nær grunnlínunni, eins og hún er skilgreind í hafréttarsamningi Sameinuðu þjóðanna, en sem nemur fjórum sjómílum,

b) einungis skal nota eitt eða fleiri inniloftnet móðurstöðvar sendiviðtækis um borð í skipi sem er staðsett 4–12 sjómílur frá grunnlínunni,

c) einungis má nota allt að 5 MHz bandbreidd (tvívirka) fyrir hvert tíðniband (1 800 MHz og 2 600 MHz),

d) mörk sem á að setja fyrir endabúnað farnets þegar hann er notaður um borð í skipi og fyrir móðurstöð sendiviðtækis í skipi:

Mæliþáttur	Lýsing
Afl sendingar/aflþéttni	Að því er varðar endabúnað farnets, sem er notaður um borð í skipum og stjórnað af móðurstöð sendiviðtækis í skipi á 1 800 MHz tíðnibandinu og 2 600 MHz tíðnibandinu, skal mesta útgeislun frálags vera: 0 dBm
Útgeislun á þilfari	Útgeislun á þilfari frá móðurstöð sendiviðtækis í skipi skal vera jöfn og eða minni en – 98 dBm/5 MHz (samsvarandi – 120 dBm/15 kHz)

Mæliþáttur	Lýsing
Reglur um aðgang að rásum og notkun þeirra	Á bilinu 4–12 sjómílur frá grunnlínunni skal gæðaviðmiðunin (lágmarkskrafa um styrk móttekins merkis í píkósellunni) vera jöfn og eða hærri en – 83 dBm/5 MHz (samsvarandi – 105 dBm/15 kHz)
	Tímastillirinn fyrir val á opinberu farneti í landi skal stilltur á 10 mínútur
	Mæliþáttur fyrir framflutning tímastillingar skal stilltur samkvæmt sviði píkósellunnar fyrir MCV-dreifiloftnetskerfis sem samsvarar 400 m
	Sleppitímamælir RRC-samskiptareglnanna fyrir aðgerðaleysi notanda skal stilltur á tvær sekúndur
Ekki samstilling við netkerfi í landi	Miðjutíðni MCV-burðarbylgjunnar skal ekki vera samstillt við burðarbylgjur netkerfa í landi“

FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/1145 **2017/EES/74/03**

frá 8. júní 2017

um töku tiltekinna fóðuraukefna af markaði, sem voru heimiluð samkvæmt tilskipunum ráðsins 70/524/EBE og 82/471/EBE, og um niðurfellingu á úreltum ákvæðum sem heimila þessi fóðuraukefni (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1831/2003 frá 22. september 2003 um aukefni í fóðri ([1]), einkum 5. mgr. 10. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í reglugerð (EB) nr. 1831/2003 er kveðið á um veitingu leyfa fyrir aukefnum til notkunar í fóður ásamt forsendum og málsmeðferð við slíka leyfisveitingu. Einkum er í 2. mgr. 10. gr., í tengslum við 7. mgr. 10. gr. þeirrar reglugerðar, kveðið á um sértæka málsmeðferð vegna endurmats á aukefnum sem eru leyfð samkvæmt tilskipun ráðsins 70/524/EBE ([2]) og tilskipun ráðsins 82/471/EBE ([3]).

2) Með 5. mgr. 10. gr. reglugerðar (EB) nr. 1831/2003 er lögð sú skylda á framkvæmdastjórnina að hún samþykki reglugerð um að taka fóðuraukefni af markaði sem voru færð inn í skrá Bandalagsins yfir fóðuraukefni sem fyrirliggjandi vörur og sem engar umsóknir, í samræmi við 2. og 7. mgr. 10. gr. reglugerðar (EB) nr. 1831/2003, voru lagðar fram fyrir innan frestsins sem kveðið er á um í þessum ákvæðum eða sem umsókn var lögð fram fyrir en síðan afturkölluð. Því ætti að taka slík fóðuraukefni af markaði. Þar eð ekki er gerður greinarmunur í 5. mgr. 10. gr. milli leyfa sem eru gefin út með tímamörkum og leyfa sem eru án tímamarka þykir rétt, fyrir skýrleika sakir, að kveða á um að taka fóðuraukefni af markaði ef takmarkaður leyfistími þeirra samkvæmt tilskipun 70/524/EBE hefur þegar runnið út.

3) Í kjölfar töku fóðuraukefnanna af markaði er rétt að fella úr gildi ákvæðin þar sem þau eru leyfð. Því ætti að breyta reglugerðum framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2316/98 ([4]), (EB) nr. 1353/2000 ([5]), (EB) nr. 2188/2002 ([6]), (EB) nr. 261/2003 ([7]), (EB) nr. 1334/2003 ([8]), (EB) nr. 1259/2004 ([9]), (EB) nr. 1288/2004 ([10]), (EB) nr. 1453/2004 ([11]), (EB) nr. 2148/2004 ([12]), (EB) nr. 255/2005 ([13]), (EB) nr. 358/2005 ([14]), (EB) nr. 521/2005 ([15]), (EB) nr. 600/2005 ([16]), (EB) nr. 833/2005 ([17]), (EB) nr. 943/2005 ([18]), (EB) nr. 1206/2005 ([19]), (EB) nr. 1458/2005 ([20]), (EB) nr. 1810/2005 ([21]), (EB) nr. 1811/2005 ([22]), (EB) nr. 2036/2005 ([23]), (EB) nr. 252/2006 ([24]), (EB) nr. 773/2006 ([25]), (EB) nr. 1284/2006 ([26]) og (ESB) nr. 1270/2009 ([27]) til samræmis við það og fella ætti reglugerðir framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 937/2001 ([28]), (EB) nr. 871/2003 ([29]), (EB) nr. 277/2004 ([30]), (EB) nr. 278/2004 ([31]), (EB) nr. 1332/2004 ([32]), (EB) nr. 1463/2004 ([33]), (EB) nr. 1465/2004 ([34]), (EB) nr. 833/2005, (EB) nr. 492/2006 ([35]), (EB) nr. 1443/2006 ([36]), (EB) nr. 1743/2006 ([37]), (EB) nr. 757/2007 ([38]) og (EB) nr. 828/2007 ([39]) úr gildi.

4) Ef um er að ræða fóðuraukefni sem umsóknir hafa eingöngu verið lagðar fram fyrir að því er varðar tilteknar dýrategundir eða flokka dýra, eða ef umsóknir hafa eingöngu verið dregnar til baka að því er varðar tilteknar dýrategundir eða flokka dýra, ætti takan af markaði einungis að varða dýrategundir og flokka dýra sem engin umsókn hefur verið lögð fram fyrir eða ef umsóknin hefur verið dregin til baka.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 166, 29.6.2017, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 194/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn, biður birtingar.

5) Að því er varðar fóðuraukefni þar sem leyfi runnu ekki út fyrir gildistökudag þessarar reglugerðar þykir rétt að heimila umbreytingartímabil fyrir hagsmunaaðila en innan þess má nýta fyrirliggjandi birgðir af viðkomandi aukefnum, forblöndum, fóðurblöndum og fóðurefnum sem hafa verið framleidd með þessum aukefnum, að teknu tilliti til geymsluþols tiltekins fóðurs sem inniheldur aukefnin sem um er að ræða.

6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Afturköllun

1. Aukefni, sem eru tilgreind í I. viðauka, skulu tekin af markaði að því er varðar þær dýrategundir eða flokka dýra sem tilgreindir eru í þeim viðauka.

2. Aukefni, sem eru tilgreind í II. viðauka, skulu tekin af markaði að því er varðar þær dýrategundir eða flokka dýra sem tilgreindir eru í þeim viðauka.

2. gr.

Umbreytingarráðstafanir

1. Fyrirliggjandi birgðir af aukefnunum sem tilgreind eru í I. viðauka má áfram setja á markað og nota fram til 19. júlí 2018.

2. Forblöndur, sem eru framleiddar með aukefnunum sem um getur í 1. mgr., má áfram setja á markað og nota fram til 19. október 2018.

3. Fóðurblöndur og fóðurefni, sem eru framleidd með fóðuraukefnunum sem um getur í 1. mgr. eða með forblöndunum sem um getur í 2. mgr., má áfram setja á markað og nota fram til 19. júlí 2019.

3. gr.

Niðurfelling

Reglugerðir (EB) nr. 937/2001, (EB) nr. 871/2003, (EB) nr. 277/2004, (EB) nr. 278/2004, (EB) nr. 1332/2004, (EB) nr. 1463/2004, (EB) nr. 1465/2004, (EB) nr. 833/2005, (EB) nr. 492/2006, (EB) nr. 1443/2006, (EB) nr. 1743/2006, (EB) nr. 757/2007 og (EB) nr. 828/2007 eru felldar úr gildi.

4. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 2316/98

Ákvæðum II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 2316/98 er breytt sem hér segir:

1) Í færslu E 4 um kopar — Cu falli orðið „Kúpríkmetiónín“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins kúpríkmetiónín.

2) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðið „Mangan-(III)-oxíð“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(III)-oxíð.

3) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðið „Mangan-(II)-karbónat“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-karbónat.

4) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðin „Mangan-(II)-vetnisfosfat, þrívatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-vetnisfosfat, þrívatnað.

5) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðin „Mangan-(II)-súlfat, fjórvatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-súlfat, fjórvatnað.

6) Í færslu E 6 um sink — Zn falli orðið „Sinkkarbónat“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins sinkkarbónat.

7) Í færslu E 6 um sink — Zn falli orðin „Sinklaktat, þrívatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins sinklaktat, þrívatnað.

8) Í færslu E 6 um sink — Zn falli orðin „Sinkklórið, einvatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins sinkklórið, einvatnað.

5. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1353/2000

Reglugerð (EB) nr. 1353/2000 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 1. gr. falli brott.

2) Ákvæði I. viðauka falli brott.

6. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 2188/2002

Í 11. færslu í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 2188/2002 um „endó-1,4-betaglúkanasa EC 3.2.1.4, endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6 og endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ falli orðið „varphænur“ brott ásamt öllum upplýsingum er varða aðeins varphænur.

7. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 261/2003

Reglugerð (EB) nr. 261/2003 er breytt sem hér segir:

1) Í stað 1. gr. komi eftirfarandi:

„1. gr.

Heimilt er að leyfa efnablönduna, sem tilheyrir flokknum „ensím“ og tilgreind er í I. viðauka, til notkunar sem aukefni í fóðri samkvæmt skilyrðunum sem mælt er fyrir um í þeim viðauka.“

2) Ákvæði II. viðauka falli brott.

8. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1334/2003

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 1334/2003 er breytt sem hér segir:

1) Í færslu E 4 um kopar — Cu falli orðið „Kúpríkmetíónín“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins kúpríkmetíónín.

2) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðið „Mangan-(III)-oxíð“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(III)-oxíð.

3) Í færslu E 5 um mangan — Mn fellur orðið „Mangan-(II)-mangan-(III)-oxíð“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-mangan-(III)-oxíð.

4) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðið „Mangan-(II)-karbónat“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-karbónat.

5) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðin „Mangan-(II)-vetnisfosfat, þrívatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-vetnisfosfat, þrívatnað.

6) Í færslu E 5 um mangan — Mn falli orðin „Mangan-(II)-súlfat, fjórvatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins mangan-(II)-súlfat, fjórvatnað.

7) Í færslu E 6 um sink — Zn falli orðið „Sinkkarbónat“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins sinkkarbónat.

8) Í færslu E 6 um sink — Zn falli orðin „Sinklaktat, þrívatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins sinklaktat, þrívatnað.

9) Í færslu E 6 um sink — Zn falla orðin „Sinkklórið, einvatnað“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins sinkklórið, einvatnað.

9. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1259/2004

Reglugerð (EB) nr. 1259/2004 er breytt sem hér segir:

1) Í stað 2. gr. komi eftirfarandi:

„2. gr.

Blöndurnar, sem tilheyra flokknum „ensím“ og eru tilgreindar í III. og VI. viðauka, eru leyfðar án tímamarka til notkunar sem aukefni í fóður með þeim skilyrðum sem mælt er fyrir um í þeim viðaukum.“

2) Ákvæði V. viðauka falli brott.

10. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1288/2004

Ákvæðum I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1288/2004 er breytt sem hér segir:

1) færsla E 161(z), um „Astaxantín-auðugan *Phaffia Rhodozyma* (ATCC 74219)“, falli brott,

2) færsla E 1704, um *„Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94“ fyrir kálfa, falli brott.

11. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1453/2004

Ákvæðum II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1453/2004 er breytt sem hér segir:

1) Færsla E 1609 um „endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8 og endó-1,4-betaglúkanasa EC 3.2.1.4“ falli brott.

2) Færsla E 1610 um „endó-1,4-betaglúkanasa EC 3.2.1.4 og endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ falli brott.

3) Færsla E 1611 um „endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6, endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8 og pólýgalaktúrónasa EC 3.2.1.15“ falli brott.

12. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 2148/2004

Reglugerð (EB) nr. 2148/2004 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 3., 4. og 5. gr. falli brott.

2) Í færslu E 567 í I. viðauka um „Klínoptílólít úr gosmyndunum“ falli orðið „kanínur“ brott ásamt öllum upplýsingum sem varða aðeins kanínur.

3) Færsla E 1706 í II. viðauka um „*Enterococcus faecium* DSM 7134, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 7133“ falli brott.

4) Ákvæði III., IV. og V. viðauka falli brott.

13. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 255/2005

Í II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 255/2005 falli færslan fyrir E 1618, „Endó-1,4-betaxýlanasi EC 3.2.1.8“ brott.

14. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 358/2005

Ákvæðum I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 358/2005 er breytt sem hér segir:

1) Færsla E 1619 um „Alfaamýlasa EC 3.2.1.1“ og „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“ falli brott.

2) Færsla E 1622 um „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“ og „Endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ falli brott.

15. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 521/2005

Reglugerð (EB) nr. 521/2005 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 1. gr. falli brott.

2) Ákvæði I. viðauka falli brott.

16. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 600/2005

Reglugerð (EB) nr. 600/2005 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 1. og 2. gr. falli brott.

2) Ákvæði I. og II. viðauka falli brott.

3) Færsla E 1709 í III. viðauka um „*Enterococcus faecium* ATCC 53519“ og „*Enterococcus faecium* ATCC 55593 (Í hlutfallinu 1/1)“ falli brott.

17. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 943/2005

Ákvæðum II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 943/2005 er breytt sem hér segir:

1) Færsla E 1630 um „Endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ og „Súbtilisín EC 3.4.21.62“ falli brott.

2) Færsla E 1631 um „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“ og „Endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ falli brott.

3) Færsla E 1632 „3-fýtasi EC 3.1.3.8“ falli brott.

18. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1206/2005

Í viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 1206/2005 falli færsla E1633 um „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“, „Endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ og „Súbtilisín EC 3.4.21.62“ brott.

19. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1458/2005

Reglugerð (EB) nr. 1458/2005 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 1. gr. falli brott.

2) Ákvæði I. viðauka falli brott.

3) Í II. viðauka við reglugerðina falli færsla 60 um „Endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ og „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“ brott.

20. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1810/2005

Í IV. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1810/2005 falli færsla 15 um „*Enterococcus faecium* NCIMB 11181“ brott.

21. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1811/2005

1) Í I. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1811/2005 falli færslan fyrir E 1635, „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“ brott.

2) Í II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1811/2005 falli færsla 63 um „Endó-1,4-betaxýlanasa EC 3.2.1.8“ og „Endó-1,3(4)-betaglúkanasa EC 3.2.1.6“ brott.

22. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 2036/2005

Reglugerð (EB) nr. 2036/2005 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 2. gr. falli brott.

2) Ákvæði II. viðauka falli brott.

23. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 252/2006

Reglugerð (EB) nr. 252/2006 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 2. gr. falli brott.

2) Ákvæði II. viðauka falli brott.

3) Í III. viðauka falli færsla E 1632 „3-fýtasi EC 3.1.3.8“ brott.

24. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 773/2006

Reglugerð (EB) nr. 773/2006 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 3. gr. falli brott.

2) Ákvæði III. viðauka falli brott.

25. gr.

Breyting á reglugerð (EB) nr. 1284/2006

Reglugerð (EB) nr. 1284/2006 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 1. og 3. gr. falli brott.

2) Ákvæði I. og III. viðauka falli brott.

26. gr.

Breyting á reglugerð (ESB) nr. 1270/2009

Reglugerð (ESB) nr. 1270/2009 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæði 1. gr. falli brott.

2) Ákvæði I. viðauka falli brott.

27. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 8. júní 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude Juncker

forseti.

(1) Stjtíð. ESB L 268, 18.10.2003, bls. 29.
(2) Tilskipun ráðsins 70/524/EBE frá 23. nóvember 1970 um aukefni í fóðri (Stjtíð. EB L 270, 14.12.1970, bls. 1).
(3) Tilskipun ráðsins 82/471/EBE frá 30. júní 1982 um ákveðnar afurðir í dýrafæðu (Stjtíð. EB L 213, 21.7.1982, bls. 8).
(4) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2316/98 frá 26. október 1998 um að leyfa ný aukefni í fóðri og um breytingu á skilyrðum varðandi leyfisveitingu fyrir nokkur aukefni sem eru þegar leyfð (Stjtíð. EB L 289, 28.10.1998, bls. 4).
(5) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1353/2000 frá 26. júní 2000 um varanlegt leyfi fyrir aukefni og bráðabirgðaleyfi fyrir nýjum aukefnum, nýrri notkun aukefna og nýjum efnablöndum í fóðri (Stjtíð. EB L 155, 28.6.2000, bls. 15).
(6) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2188/2002 frá 9. desember 2002 um bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun aukefna í fóðri (Stjtíð. EB L 333, 10.12.2002, bls. 5).
(7) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 261/2003 frá 12. febrúar 2003 um bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun aukefna í fóðri (Stjtíð. ESB L 37, 13.2.2003, bls. 12).
(8) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1334/2003 frá 25. júlí 2003 um breytingu á skilyrðum varðandi leyfi fyrir nokkrum aukefnum úr flokki snefilefna í fóðri (Stjtíð. ESB L 187, 26.7.2003, bls. 11).
(9) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1259/2004 frá 8. júlí 2004 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 239, 9.7.2004, bls. 8).

([10]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1288/2004 frá 14. júlí 2004 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun aukefnis sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 243, 15.7.2004, bls. 10).
([11]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1453/2004 frá 16. ágúst 2004 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 269, 17.8.2004, bls. 3).
([12]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2148/2004 frá 16. desember 2004 um varanleg leyfi og bráðabirgðaleyfi fyrir tilteknum aukefnum og leyfi fyrir nýrri notkun aukefnis sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 370, 17.12.2004, bls. 24).
([13]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 255/2005 frá 15. febrúar 2005 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 45, 16.2.2005, bls. 3).
([14]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 358/2005 frá 2. mars 2005 um ótímabundið leyfi fyrir tilteknum aukefnum og leyfi fyrir nýrri notkun aukefna sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 57, 3.3.2005, bls. 3).
([15]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 521/2005 frá 1. apríl 2005 um varanlegt leyfi fyrir aukefni og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun tiltekinna aukefna sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 84, 2.4.2005, bls. 3).
([16]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 600/2005 frá 18. apríl 2005 um nýtt leyfi til 10 ára til að nota hnislalyf sem aukefni í fóðri, um bráðabirgðaleyfi fyrir aukefni og varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 99, 19.4.2005, bls. 5).
([17]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 833/2005 frá 31. maí 2005 um varanlegt leyfi fyrir aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 138, 1.6.2005, bls. 5).
([18]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 943/2005 frá 21. júní 2005 um varanlegt leyfi fyrir aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 159, 22.6.2005, bls. 6).
([19]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1206/2005 frá 27. júlí 2005 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 197, 28.7.2005, bls. 12).
([20]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1458/2005 frá 8. september 2005 um varanlegt leyfi og bráðabirgðaleyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun tiltekinna aukefna sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 233, 9.9.2005, bls. 3).
([21]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1810/2005 frá 4. nóvember 2005 um nýtt leyfi til 10 ára fyrir aukefni í fóðri, varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun tiltekinna aukefna sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 291, 5.11.2005, bls. 5).
([22]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1811/2005 frá 4. nóvember 2005 um bráðabirgðaleyfi og varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun tiltekins aukefnis sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 291, 5.11.2005, bls. 12).
([23]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2036/2005 frá 14. desember 2005 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun aukefnis sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 328, 15.12.2005, bls. 13).
([24]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 252/2006 frá 14. febrúar 2006 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun tiltekinna aukefna sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 44, 15.2.2006, bls. 3).
([25]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 773/2006 frá 22. maí 2006 um bráðabirgðaleyfi og varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun aukefnis sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 135, 23.5.2006, bls. 3).
([26]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1284/2006 frá 29. ágúst 2006 um varanleg leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 235, 30.8.2006, bls. 3).
([27]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1270/2009 frá 21. desember 2009 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 339, 22.12.2009, bls. 28).
([28]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 937/2001 frá 11. maí 2001 um að leyfa nýja notkun aukefna, nýja aukefnablöndu, framlengingu bráðabirgðaleyfa og 10 ára leyfi fyrir aukefni í fóðri (Stjtíð. EB L 130, 12.5.2001, bls. 25).
([29]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 871/2003 frá 20. maí 2003 um varanlegt leyfi fyrir nýja aukefninu trímangantetraoxíði í fóðri (Stjtíð. ESB L 125, 21.5.2003, bls. 3).
([30]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 277/2004 frá 17. febrúar 2004 um leyfi án tímamarka fyrir aukefni í fóðri (Stjtíð. ESB L 47, 18.2.2004, bls. 20).
([31]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 278/2004 frá 17. febrúar 2004 um bráðabirgðaleyfi fyrir nýrri notkun aukefnis sem þegar er leyft að nota í fóður (Stjtíð. ESB L 47, 18.2.2004, bls. 22).
([32]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1332/2004 frá 20. júlí 2004 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 247, 21.7.2004, bls. 8).
([33]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1463/2004 frá 17. ágúst 2004 um leyfi til 10 ára til að nota í fóðri aukefnið sakox 120 örkyrni, sem er í flokknum hnislalyf og önnur lyf (Stjtíð. ESB L 270, 18.8.2004, bls. 5).
([34]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1465/2004 frá 17. ágúst 2004 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 270, 18.8.2004, bls. 11).
([35]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 492/2006 frá 27. mars 2006 um bráðabirgðaleyfi og varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 89, 28.3.2006, bls. 6).
([36]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1443/2006 frá 29. september 2006 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri og leyfi til 10 ára fyrir hnislalyfi (Stjtíð. ESB L 271, 30.9.2006, bls. 12).
([37]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1743/2006 frá 24. nóvember 2006 um varanlegt leyfi fyrir aukefni í fóðri (Stjtíð. ESB L 329, 25.11.2006, bls. 16).

([38]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 757/2007 frá 29. júní 2007 um varanlegt leyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 172, 30.6.2007, bls. 43).

([39]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 828/2007 frá 13. júlí 2007 um varanlegt leyfi og bráðabirgðaleyfi fyrir tilteknum aukefnum í fóðri (Stjtíð. ESB L 184, 14.7.2007, bls. 12).

I. VIÐAUKI

Aukefni sem um getur í 1. mgr. 1. gr.

A-HLUTI

Fóðuraukefni sem skal afturkalla að því er varðar allar dýrategundir og flokka dýra

Kenninúmer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
	Rotvarnarefni	
E 201	Natríumsorbat	Allar tegundir
E 203	Kalsíumsorbat	Allar tegundir
E 261	Kalíumasetat	Allar tegundir
E 283	Kalíumprópíónat	Allar tegundir
E 333	Kalsíumsítröt	Allar tegundir
E 334	L-vínsýra	Allar tegundir
E 335	Natríum-L-tartrat	Allar tegundir
E 336	Kalíum-L-tartrat	Allar tegundir
E 337	Kalíumnatríum-L-tartrat	Allar tegundir
E 507	Saltsýra	Allar tegundir
E 513	Brennisteinssýra	Allar tegundir
	Þráavarnarefni	
E 308	Tilbúið gamma-tókóferól	Allar tegundir
E 309	Tilbúið delta-tókóferól	Allar tegundir
E 311	Oktýlgallat	Allar tegundir
E 312	Dódekýlgallat	Allar tegundir
	Bindiefni, kekkjavarnar- og storkuefni	
E 330	Sítrónusýra	Allar tegundir

Kenninúmer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
	Litgjafar, að meðtöldum litarefnum	
	Aðrir litgjafar	
Viðeigandi E-númer	Litunarefni sem hafa verið leyfð til litunar matvæla með reglum Bandalagsins að undanskildu allúrarauðu E 129, gljáandisvörtu PN E 151, skærbláu FCF E 133, karamellubrúnu E150b, E150c og E150d, klórófýllkoparflóka E 141, erýtrósíni E 127, indígótíni E 132, járnoxíðrauðu, -svörtu og -gulu E 172, ponceau 4 R E 124, títandíoxíði (anatas- og rútílform) E 171, viðarkolsvörtu E 153, tartrasíni E 102, sólsetursgulu FCF E 110.	Allar tegundir
E 142	Súrskærgrænt BS/lissamíngrænt	Allar tegundir
	Ýruefni og stöðgarar, þykkingarefni og hleypiefni	
E322	Lesitín (aðeins sem stöðgarar, þykkingarefni og hleypiefni)	Allar tegundir
E 400	Algínsýra	Allar tegundir
E 402	Kalíumalgínat	Allar tegundir
E 404	Kalsíumalgínat	Allar tegundir
E 405	Própan-1,2-díólalgínat (própýlenglýkólalgínat)	Allar tegundir
E 432	Pólýoxýetýlen(20)sorbítanmónólárat	Allar tegundir
E 434	Pólýoxýetýlen(20)sorbítanmónópalmítat	Allar tegundir
E 435	Pólýoxýetýlen(20)sorbítanmónósterat	Allar tegundir
E 436	Pólýoxýetýlen(20)sorbítantrísterat	Allar tegundir
E 465	Etýlmetýlsellulósi	Allar tegundir
E 473	Súkrósaestrar af fitusýrum (estrar af sakkarósa og ætum fitusýrum)	Allar tegundir
E 474	Súkróglýseríð (blanda af estrum af sakkarósa og ein- og tvíglýseríðum af ætum fitusýrum)	Allar tegundir
E 475	Pólýglýserólestri úr ófjölliðuðum ætum fitusýrum	Allar tegundir
E 477	Einestrar af própan-1,2-díóli (própýlenglýkól) og ætum fitusýrum, eingöngu eða í blöndum með tvíestrum	Allar tegundir
E 480	Steróýl-2-laktýlsýra	Allar tegundir
E 481	Natríumsteróýl-2-laktýlat	Allar tegundir
E 482	Kalsíumsteróýl-2-laktýlat	Allar tegundir
E 483	Steryltartrat	Allar tegundir
E 486	Dextran	Allar tegundir

Kenninúmer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
E 491	Sorbítanmónósterat	Allar tegundir
E 492	Sorbítantrísterat	Allar tegundir
E 494	Sorbítanmónóóleat	Allar tegundir
E 495	Sorbítanmónópalmítat	Allar tegundir
E 496	Pólýetýlenglýkól 6000	Allar tegundir
E 497	Fjölliður pólýoxýprópýlenpólýoxýetýlens (sameindamassi: 6 800–9 000)	Allar tegundir
	Snefilefni	
E 1	**Járn — Fe**, ferróklóríð, fjórvatnað	Allar tegundir
E 1	**Járn — Fe**, ferrósítrat, sexvatnað	Allar tegundir
E 1	**Járn — Fe**, ferrólaktat, þrívatnað	Allar tegundir
E 2	**Joð — I**, kalsíumjoðat, sexvatnað	Allar tegundir
E 2	**Joð — I**, natríumjoðíð	Allar tegundir
E 4	**Copper — Cu**, kúprímeþíónín	Allar tegundir
E 5	**Mangan — Mn**, mangan-(III)-oxíð	Allar tegundir
E 5	**Mangan — Mn**, trímangantetraoxíð	Allar tegundir
E 5	**Mangan — Mn**, mangankarbónat	Allar tegundir
E 5	**Mangan — Mn**, manganvetnisfosfat, þrívatnað	Allar tegundir
E 5	**Mangan — Mn**, mangansúlfat, fjórvatnað	Allar tegundir
E 6	**Sink — Zn**, sinkkarbónat	Allar tegundir
E 6	**Sink — Zn**, sinkklóríðmónóhýdrat	Allar tegundir
E 6	**Sink — Zn**, sinklaktat, þrívatnað	Allar tegundir
E 7	**Mólýbden— Mo**, ammóníummólýbdat	Allar tegundir
E 8	**Selen — Se**, natríumselenat	Allar tegundir
	Vítamín, forvítamín og efnafræðilega vel skilgreind efni með áþekka verkun	
	Betaín. Öll form að undanskildu vatnsfríu betaíni og betaínhýdróklóríði	Allar tegundir
	Bíótín. Öll form að undanskildu D-(+)-bíótíni	Allar tegundir

Kenninúmer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
	Karnitín. Öll form að undanskildu L-karnitíni og L-karnitín-L-tartrati	Allar tegundir
	Kólín. Öll form að undanskildu kólínklóríði	Allar tegundir
	Fólat. Öll form fólats að undanskildu fólínsýru	Allar tegundir
	Níasín. Öll form níasíns að undanskildu níasíni 99% og níasínamíði	Allar tegundir
	Lífsnauðsynlegar ómettaðar ómega-3-fitusýrur	Allar tegundir
	Lífsnauðsynlegar ómettaðar ómega-6-fitusýrur (allar að undanskilinni oktadekadíensýru)	Allar tegundir
	Pantóþensýra. Öll form að undanskildu kalsíum-D-pantóþenati og D-panþenóli	Allar tegundir
	Paraamínóbensósýra (PABA)	Allar tegundir
	Þíamín. Öll form að undanskildu þíamínvetnisklóríði og þíamínmónónítrati	Allar tegundir
	A-vítamín. Öll form að undanskildu retínýlasetati, retínýlpalmítati og retínýlprópíónati	Allar tegundir
	B_6-vítamín. Öll form að undanskildu pýridoxínhýdróklóríði	Allar tegundir
	C-vítamín. Öll form að undanskilinni askorbínsýru, natríumaskorbýlfosfati og natríumkalsíumaskorbýlfosfati	Allar tegundir
	E-vítamín. Öll form að undanskildu *alhandhverfujöfnu alfatókóferýlasetati, RRR-alfatókóferýlasetati og RRR-alfatókóferóli*	Allar tegundir
	K-vítamín. Öll form af K-vítamíni að undanskildu K_3-vítamíni sem menadíónnikótínamíðbísúlfít og sem L-menadíónnatríumbísúlfít	Allar dýrategundir
	Amínósýrur, sölt þeirra og hliðstæð efni	
3.1.3.	Meþíónín/meþíónínsink, tæknilega hreint	Allar tegundir
3.2.1.	Lýsín/L-lýsín, tæknilega hreint	Allar tegundir
3.4.2.	DL-trýptófan, tæknilega hreint	Allar tegundir
	Votfóðursaukefni	
	Ensím	
	Xýlanasi EC 3.2.1.8 úr *Trichoderma longibrachiatum* rifar IMI SD185	Allar tegundir

Kenninúmer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
	Örverur	
	Enterococcus faecium BIO 34	Allar tegundir
	Lactobacillus salivarius CNCM I-3238/ATCC 11741	Allar tegundir
	Pediococcus pentosaceus NCIMB 30089	Allar tegundir
	Efni	
	Formaldehýð	Allar tegundir
	Natríumbísúlfat	Allar tegundir
	Bragðefni og lystaukandi efni	
	Náttúruleg efni — grasafræðilega skilgreind	
	Tinktúra úr birki, CoE-nr. 88	Allar tegundir
	Náttúruleg efni og samsvarandi tilbúin efni	
	CAS-nr. 16630-52-7/3-(metýlþió)bútanal/Flavis-nr. 12.056	Allar tegundir
	CAS-nr. 2179-60-4/metýlpropýldísúlfíð/Flavis-nr. 12.019	Allar tegundir
	CAS-nr. 36431-72-8/2-þeaspíran/Flavis-nr. 13.098	Allar tegundir
	CAS-nr. 3738-00-9/1,5,5,9-tetrametýl-13-oxatrísýkló [8.3.0.0.(4.9)]trídekan/Flavis-nr. 13.072	Allar tegundir
	CAS-nr. 40789-98-8/3-merkaptóbútan-2-ón/Flavis-nr. 12.047	Allar tegundir
	CAS-nr. 43040-01-3/3-metýl-1,2,4-tríþían/Flavis-nr. 15.036	Allar tegundir
	CAS-nr. 495-62-5/1,4-(8),12-bisabólatríen/Flavis-nr. 01.016	Allar tegundir
	CAS-nr. 516-06-3/D,L-valín/Flavis-nr. 17.023	Allar tegundir
	CAS-nr. 5756-24-1/dímetýltetrasúlfíð/Flavis-nr. 12.116	Allar tegundir
	CAS-nr. 6028-61-1/díprópýltrísúlfíð/Flavis-nr. 12.023	Allar tegundir
	CAS-nr. 689-67-8/6,10-dímetýl-5,9-úndekadíen-2-ón/Flavis-nr. 07.216	Allar tegundir
	CAS-nr. 78-98-8/2-oxóprópanal/Flavis-nr. 7.001	Allar tegundir

B-HLUTI

Fóðuraukefni sem skal afturkalla að því er varðar tilteknar dýrategundir eða flokka dýra

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
	Rotvarnarefni	
E 214	Etýl-4-hýdroxýbensóat	Gæludýr
E 215	Natríumetýl-4-hýdroxýbensóat	Gæludýr
E 216	Própýl-4-hýdroxýbensóat	Gæludýr
E 217	Natríumpróýl-4-hýdroxýbensóat	Gæludýr
E 218	Metýl-4-hýdroxýbensóat	Gæludýr
E 219	Natríummetýl-4-hýdroxýbensóat	Gæludýr
E 222	Natríumbísúlfít	Hundar, kettir
E 223	Natríummetabísúlfít	Hundar, kettir
E 285	Metýlpróþíónsýra	Jórturdýr, við upphaf jórturs
	Sýrustillar	
E 210	Bensósýra	Eldissvín
E 340(iii)	Tríkalíumortófosfat	Kettir, hundar
E 350(i)	Natríummalat (salt af DL- eða L-eplasýru)	Kettir, hundar
E 507	Saltsýra	Kettir, hundar
E 513	Brennisteinssýra	Kettir, hundar
	Bindiefni, kekkjavarnar- og storkuefni	
E 567	Klínoptílólít úr gosmyndunum	Kanínur
E 598	Tilbúin kalsíumálöt	Mjólkurkýr, eldisnautgripir, kálfar, lömb, kiðlingar, alifuglar, kanínur, svín
	Litgjafar, að meðtöldum litarefnum	
	Karótenóíð og xantófýll	
E 161b	Lútín	Kettir og hundar
E 160c	Kapsantín	Kalkúnar

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
E 161c	Kryptóxantín	Alifuglar
E 160e	β-apó-8′-karótenal	Alifuglar
E 161g	Kantaxantín	Allar dýrategundir og öll notkun að undanskildum: — Eldiskjúklingum og aukategundum alifugla til notkunar sem fellur undir virkan hóp 2 a) ii) — Alifuglum til varps og alifuglum sem eru aldir til að verða varpfuglar til notkunar sem fellur undir virkan hóp 2 a) ii) — Skrautfuglum og skrautfiskum til notkunar sem fellur undir virkan hóp 2 a) iii)
E 161j	Astaxantín	Allar dýrategundir, að undanskildum: — Laxi og urriða til notkunar sem fellur undir virkan hóp 2 a) i) og 2 a) iii) — Skrautfiskum til notkunar sem fellur undir virkan hóp 2 a) i)
E 161z	Astaxantín-auðugur *Phaffia Rhodozyma* (ATCC 74219)	Lax, urriði
	Aðrir litgjafar	
E 155	Brúnt HT	Kettir, hundar
E 104	Kínólíngult	Dýr sem gefa af sér afurðir til manneldis
E 122	Asórúbín (karmósín)	Allar tegundir að undanskildum köttum og hundum
E 160b	Bixín	Allar tegundir að undanskildum hundum og köttum
	Ýruefni og stöðgarar, þykkingarefni og hleypiefni	
E 401	Natríumalgínat	Allar tegundir að undanskildum fiskum, gæludýrum og öðrum dýrum sem gefa ekki af sér afurðir til manneldis (loðdýr sem gefa ekki af sér afurðir til manneldis)
E 403	Ammóníumalgínat	Allar tegundir eða flokkar dýra, að undanskildum búrfiskum
E 406	Agar	Allar tegundir að undanskildum gæludýrum og öðrum dýrum sem gefa ekki af sér afurðir til manneldis (loðdýr sem gefa ekki af sér afurðir til manneldis)

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
E 407	Karragenan	Allar tegundir að undanskildum gæludýrum og öðrum dýrum sem gefa ekki af sér afurðir til manneldis (loðdýr sem gefa ekki af sér afurðir til manneldis)
E 418	Gellangúmmí	Hundar, kettir
E 488	Pólýoxýetýlað glýseríð af tólgarfitusýrum	Kálfar
E 489	Estri af pólýglýseróli og alkóhóli sem fæst með afoxun olíu- og palmitínsýra	Kálfar
E 498	Hlutestrar pólýglýseróls af fjölþéttum fitusýrum úr laxerolíu	Hundar
	Ensím	
E 1600	3-fýtasi/EC 3.1.3.8 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 114.94)	Smágrísir, eldissvín, gyltur, eldiskjúklingar, varphænur
E 1600	3-fýtasi/EC 3.1.3.8 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 114.94)	Eldiskalkúnar
E 1605	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 520.94)	Eldiskjúklingar
E 1608	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8/Endó-1,4-beta-glúkanasi/EC 3.2.1.4 sem er framleiddur með *Humicola insolens* (DSM 10442)	Eldiskjúklingar
E 1609	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8/Endó-1,4-beta-glúkanasi/EC 3.2.1.4 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 600.94) (húðað form, fast form og vökvaform)	Eldiskjúklingar, eldiskalkúnar, fráfærugrísir
E 1609	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8/Endó-1,4-beta-glúkanasi/EC 3.2.1.4 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 600.94) (kornað form)	Eldiskjúklingar, eldiskalkúnar, fráfærugrísir
E 1610	Endó-1,4-betaglúkanasi/EC 3.2.1.4/Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 600.94)	Eldiskjúklingar
E 1611	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106)/Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (IMI SD 135)/pólýgalaktúrónasi/EC 3.2.1.15 sem er framleiddur með *Aspergillus aculeatus* (CBS 589.94)	Eldissvín

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
E 1614	6-fýtasi/EC 3.1.3.26 sem er framleiddur með *Aspergillus oryzae* (DSM 11857)	Eldiskjúklingar, varphænur, eldiskalkúnar, smágrísir, eldissvín, gyltur
E 1615	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (CNCM MA 6-10 W)	Eldiskjúklingar
E 1618	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (CBS 270.95)	Eldiskjúklingar, eldiskalkúnar
E 1619	Alfaamýlasi/EC 3.2.1.1/Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 9553)	Eldiskjúklingar
E 1622	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6/Endó-1,4-betaxýlanasi/ EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (CBS 357.94)	Eldiskjúklingar
E 1623	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106), endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og súbtilisín/EC 3.4.21.62 sem er framleitt með *Bacillus subtilis* (ATCC 2107)	Eldiskjúklingar
E 1624	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106), endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (IMI SD 135) og alfaamýlasi/EC 3.2.1.1 sem er framleiddur með *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 9553)	Fráfærugrísir
E 1625	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106), endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (IMI SD 135), alfaamýlasi/EC 3.2.1.1 sem er framleiddur með *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 9553) og pólýgalaktúrónasi/EC 3.2.1.15 sem er framleiddur með *Aspergillus aculeatus* (CBS 589.94)	Fráfærugrísir
E 1626	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og súbtilisín/EC 3.4.21.62 sem er framleitt með *Bacillus subtilis* (ATCC 2107)	Fráfærugrísir
E 1627	Endó-1,3-(4)betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106) og endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105)	Eldissvín

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
E 1628	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105)	Fráfærugrísir, eldissvín, eldiskjúklingar
E 1629	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og endó-1,3(4)betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106)	Eldiskjúklingar
E 1630	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og súbtilisín/EC 3.4.21.62 sem er framleitt með *Bacillus subtilis* (ATCC 2107)	Eldiskjúklingar
E 1631	Endó-1,3-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106) og endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (IMI SD 135)	Eldiskjúklingar
E 1632	3-fýtasi/EC 3.1.3.8 sem er framleiddur með *Trichoderma reesei* (CBS 528.94)	Eldiskjúklingar, fráfærugrísir, eldissvín
E 1633	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106), endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og súbtilisín/EC 3.4.21.62 sem er framleitt með *Bacillus subtilis* (ATCC 2107)	Eldiskjúklingar
E 1634	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Aspergillus niger* (MUCL 39199)	Eldiskjúklingar
E 1635	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/(EC 3.2.1.6) sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106)	Eldiskjúklingar
E 1636	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi, sem er framleiddur með *Trichoderma reesei* (CBS 526.94/EC 3.2.1.6)	Fráfærugrísir, eldiskjúklingar
E 1637	Endó-1,4-betaxýlanasi sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105)/EC 3.2.1.8 og endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 og alfaamýlasi sem er framleiddur með *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 9553)/EC 3.2.1.1, súbtilisín sem er framleitt með *Bacillus subtilis* (ATCC 2107)/EC 3.4.21.62 og pólýgalaktúrónasi sem er framleiddur með *Aspergillus aculeatus* (CBS 589.94)/EC 3.2.1.15	Eldiskjúklingar

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
E 1638	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106), endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og alfaamýlasi/EC 3.2.1.1 sem er framleiddur með *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 9553)	Fráfærugrísir
E 1639	3-fýtasi sem er framleiddur með *Hansenula polymorpha* (DSM 15087)	Eldiskjúklingar, eldiskalkúnar, varphænur, smágrísir, eldissvín, gyltur
E 1640	6-fýtasi sem er framleiddur með *Schizosaccharomyces pombe* (ATCC 5233)/EC 3.1.3.26	Eldiskjúklingar
E 1641	Endó-1,4-betaxýlanasi sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (MUCL 39203)/EC 3.2.1.8	Eldiskjúklingar
	Örverur	
E 1704	*Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94	Kálfar
E 1706	*Enterococcus faecium* DSM 7134, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 7133	Fráfærugrísir
E 1709	*Enterococcus faecium* ATCC 53519, *Enterococcus faecium* ATCC 55593 (Í hlutfallinu 1/1)	Eldiskjúklingar
E 1714	*Lactobacillus farciminis* CNCM MA 67/AR	Fráfærugrísir
	Efnafræðilega vel skilgreind efni með áþekka líffræðilega verkun og vítamín	
3a900	Inósítól	Allar tegundir að undanskildum fiskum og krabbadýrum
—	Lífsnauðsynlegar ómettaðar ómega-6-fitusýrur (sem okta-dekadíensýra)	Allar tegundir, að undanskildum eldissvínum, gyltum til undaneldis, gyltum til að fá smágrísi, kúm til undaneldis, mjólkurkúm til mjólkurframleiðslu
3a370	Tárín	Allar tegundir, að undanskildum dýrum af hundaætt, kattaætt og marðarætt og fisktegundum sem eru kjötætur
E 670	D_2-vítamín	Svín, smágrísir, nautgripir, sauðfé, kálfar, dýr af hestaætt, aðrar tegundir eða flokkar dýra að undanskildum alifuglum og fiskum
	Þvagefni og afleiður þess	
2.1.2.	Bíúret, tæknilega hreint	Jórturdýr, frá upphafi jórturs

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
2.1.3.	Úreafosfat, tæknilega hreint	Jórturdýr, frá upphafi jórturs
2.1.4.	Díúreídóísóbútan, tæknilega hreint	Jórturdýr, frá upphafi jórturs
	Bragðefni og lystaukandi efni	
	Náttúruleg efni og samsvarandi tilbúin efni	
	CAS-nr. 134-20-3/metýlantranílat/Flavis-nr. 09.715	Fuglategundir
	CAS-nr. 85-91-6/metýl-N-metýlantranílat/Flavis-nr. 09.781	Fuglategundir
	CAS-nr. 93-28-7/evgenýlasetat/Flavis-nr. 09.020	Alifuglar og fiskar
	CAS-nr. 97-53-0/evgenól/Flavis-nr. 04.003	Fiskar
	CAS-nr. 107-85-7/3-metýlbútýlamín/Flavis-nr. 11.001	Varphænur
	CAS-nr. 75-50-3/trímetýlamín/Flavis-nr. 11.009	Varphænur
	CAS-nr. 6627-88-9/4-allýl-2,6-dímetoxýfenól/Flavis-nr. 04.051	Fiskar og alifuglar
	CAS-nr. 593-81-7/trímetýlamínhýdróklóríð/Flavis-nr. 11.024	Varphænur

II. VIÐAUKI

Fóðuraukefni sem um getur í 2. mgr. 1. gr.

Kenni-númer	Aukefni	Tegund eða flokkur dýra
	Ensím	
11	Endó-1,4-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6/Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 og endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 74 252)	Varphænur
28	3-fýtasi/EC 3.1.3.8 sem er framleiddur með *Trichoderma reesei* (CBS 528.94)	Varphænur
30	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6/Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Penicillium funiculosum* (IMI SD 101)	Fráfærugrísir, eldisendur
37	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og súbtilisín/EC 3.4.21.62 sem er framleitt með *Bacillus subtilis* (ATCC 2107)	Varphænur
51	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Bacillus subtilis* (LMG S-15136)	Eldissvín
60	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2105) og endó-1,3(4)betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma longibrachiatum* (ATCC 2106)	Eldiskalkúnar
63	Endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Trichoderma reesei* (CBS 529.94) og endó-1,3(4)betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Trichoderma reesei* (CBS 526.94)	Eldiskalkúnar, eldiskjúklingar
64	Endó-1,3(4)-betaglúkanasi/EC 3.2.1.6 sem er framleiddur með *Aspergillus aculeatus* (CBS 589.94) og endó-1,4-betaxýlanasi/EC 3.2.1.8 sem er framleiddur með *Aspergillus oryzae* (DSM 10287)	Eldiskjúklingar, fráfærugrísir
	Örverur	
15	*Enterococcus faecium* NCIMB 11181	Eldiskjúklingar
24	*Kluyveromyces marxianus var. lactis* K1 BCCM/MUCL 39434	Mjólkurkýr
25	*Lactobacillus acidophilus* DSM 13241	Kettir, hundar
	Hníslalyf og önnur lyf	
E 764	Halófúgínónhýdróbrómíð 6g/kg (Stenorol)	Kjúklingar sem eru aldir til að verða varphænur
E 766	Natríumsalínómýsín 120 g/kg (Sacox 120) (leyfishafi er Huvepharma NV)	Eldiskanínur
E 766	Natríumsalínómýsín 120 g/kg (Salinomax 120G) (leyfishafi er Zoetis Belgium SA)	Eldiskjúklingar

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/1432 2017/EES/74/04

frá 7. ágúst 2017

um breytingu á reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 um setningu plöntuverndarvara á markað að því er varðar viðmiðanir fyrir samþykki fyrir áhættulitlum virkum efnum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 frá 21. október 2009 um setningu plöntuverndarvara á markað og um niðurfellingu á tilskipunum ráðsins 79/117/EBE og 91/414/EBE ([1]), einkum 3. mgr. 22. gr. í tengslum við a-lið 1. mgr. 78. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Markmiðið með reglugerð (EB) nr. 1107/2009 er að greiða fyrir setningu plöntuverndarvara, sem innihalda áhættulítil virk efni, á markað með því að setja viðmiðanir um tilgreiningu áhættulítilla virkra efna og flýta fyrir málsmeðferð við leyfisveitingu að því er varðar áhættulitlar vörur.

2) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/128/EB ([2]) stuðlar að samþættum vörnum gegn skaðvöldum þar sem lögð er áhersla á notkun plöntuverndarvara ásamt öðrum aðferðum, sem ekki byggjast á notkun efna, sem hafa sem fæstar aukaverkanir á heilbrigði manna, lífverur utan markhóps og umhverfið. Einkum er í 12. gr. hennar kveðið á um að byrja eigi á að athuga hvort nota megi áhættulitlar plöntuverndarvörur ef um er að ræða notkun plöntuverndarvara á tilteknum svæðum, t.d. svæðum sem almenningur notar.

3) Í samræmi við 22. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009 gildir 5. liður II. viðauka við þá reglugerð um tilgreiningu áhættulítilla virkra efna sem eru í samræmi við viðmiðanirnar í 4. gr. þeirrar reglugerðar.

4) Í 5. lið II. viðauka er vísað í nokkra hættuundirflokka sem mælt er fyrir um í reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 ([3]). Til glöggvunar og til að endurspegla samhliða beitingu þeirrar reglugerðar er rétt að kveða á um frekari upplýsingar að því er varðar þessa hættuundirflokka.

5) Í samræmi við 16. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2000/60/EB ([4]) eru efni, sem skapa verulega áhættu fyrir vatnsumhverfið eða í gegnum það, skilgreind sem forgangsefni á vettvangi Sambandsins og tilgreind í X. viðauka við þá tilskipun. Því ættu slík tilgreind forgangsefni ekki að teljast áhættulítil virk efni.

6) Í ljósi nýjustu vísinda- og tækniþekkingar gætu viðmiðanir sem varða þrávirkni og lífþéttni komið í veg fyrir að tiltekin efni, sem koma fyrir í náttúrunni og skapa töluvert minni áhættu en önnur virk efni, s.s. tiltekin plöntuefni eða steinefni, verði samþykkt sem áhættulítil efni. Því er rétt að heimila að slík efni verði samþykkt sem áhættulítil efni í þeim tilvikum þar sem þau eru í samræmi við 22. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009.

7) Boðskiptaefni, sem eru efni sem plöntur, dýr og aðrar lífverur gefa frá sér og eru notuð til boðskipta innan og milli dýrategunda, hafa sértækan og óeitraðan verkunarhátt og koma fyrir frá náttúrunnar hendi. Þau eru yfirleitt skilvirk í mjög litlu magni sem oft er sambærilegt við gildi sem koma fyrir frá náttúrunnar hendi ([5]). Í ljósi núverandi vísinda- og tækniþekkingar er einnig rétt að kveða á um að boðskiptaefni ættu að teljast vera áhættulítil efni.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 205, 8.8.2017, bls. 59. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 195/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 309, 24.11.2009, bls. 1.

([2]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/128/EB frá 21. október 2009 um aðgerðaramma Bandalagsins til að ná fram sjálfbærri notkun varnarefna (Stjtíð. ESB L 309, 24.11.2009, bls. 71).

([3]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

([4]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2000/60/EB frá 23. október 2000 um aðgerðaramma Bandalagsins um stefnu í vatnsmálum (Stjtíð. EB L 327, 22.12.2000, bls. 1).

([5]) „OECD Report of the 5th Biopesticides Steering Group Seminar on application techniques for microbial pest control products and semiochemicals: use scenarios and associated risks“, ENV/JM/MONO(2015)38.

8) Virk efni í skilningi 2. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009 ná yfir örverur með eiginleika sem eru frábrugðnir eiginleikum hreinna efna. Rétt þykir að viðmiðanir um litla áhættu, sem gilda um örverur, séu settar á grundvelli núverandi vísinda- og tækniþekkingar.

9) Örverur sem nota á í plöntuverndarvörur eru metnar á grundvelli stofns í samræmi við sértækar kröfur um gögn sem mælt er fyrir um í B-hluta viðaukans við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 283/2013 ([1]). Af þessum sökum ætti einnig að tilgreina og lýsa eiginleikum örvera á grundvelli stofns þegar metið er hvort þær eru í samræmi við viðmiðanirnar um áhættulítil efni þar eð eiturefnafræðilegir eiginleikar mismunandi stofna, sem tilheyra sömu tegundum örvera, geta verið mjög mismunandi. Örvera getur talist vera áhættulítil nema hún hafi, á grundvelli stofns, sýnt margþætt þol gegn sýkingalyfjum sem notuð eru í manna- eða dýralyf.

10) Taka ætti skýrt fram að bakúlóveira, sem er hýsilsérhæfð ætt veira sem sýkir eingöngu liðdýr og kemur aðallega upp í ættbálknum *Lepidoptera* (fiðrildi), skal teljast vera áhættulítið efni þar eð engar niðurstöður úr rannsóknum liggja fyrir um að bakúlóveiran hafi neikvæð áhrif á dýr eða menn ([2]). Bakúlóveiran skal teljast vera áhættulítil nema hún hafi, á grundvelli stofns, sýnt skaðleg áhrif á skordýr utan markhóps.

11) Því ætti að breyta 5. lið II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1107/2009 til samræmis við það.

12) Breyttu viðmiðanirnar endurspegla núverandi stöðu vísinda- og tækniþekkingar og skýra nánar núgildandi viðmiðanir í 5. lið. Því ætti nýju viðmiðanirnar að taka gildi eins fljótt og auðið er nema viðkomandi nefnd hafi kosið um drög að reglugerð, sem lögð hafa verið fyrir hana, án þess að framkvæmdastjórnin hafi samþykkt þá reglugerð fyrir 28. ágúst 2017.

13) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Ákvæðum II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1107/2009 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

Ákvæði 5. liðar II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1107/2009, eins og henni var breytt með þessari reglugerð, gildir frá og með 28. ágúst 2017, að undanskildum málsmeðferðarreglum ef nefndin hefur kosið um drög að reglugerð, sem lögð hafa verið fyrir hana, án þess að þau drög að reglugerð hafi verið samþykkt fyrir 28. ágúst 2017.

3. gr.

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

([1]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 283/2013 frá 1. mars 2013 um kröfur um gögn varðandi virk efni í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 um setningu plöntuverndarvara á markað (Stjtíð. ESB L 93, 3.4.2013, bls. 1).

([2]) Vísindanefnd Matvælaöryggisstofnunar Evrópu um líffræðilega hættu (EFSA BIOHAZ), 2013. „Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed“ (2013, uppfærsla). *Tíðindi Matvælaöryggisstofnunar Evrópu* 2013, 11(11), 3449, (107 bls). doi:10.2903/j.efsa.2013.3449.

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

Gjört í Brussel 7. ágúst 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

———

VIÐAUKI

Í stað 5. liðar II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1107/2009 komi eftirfarandi:

„5. Áhættulítil virk efni

5.1. Virk efni, að undanskildum örverum

5.1.1. Virkt efni, að undanskildum örverum, skal ekki teljast vera áhættulítið ef það hefur einn eða fleiri af eftirtöldum eiginleikum:

a) Það er eða hefur verið flokkað í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1272/2008 sem eitthvað af eftirfarandi:

— krabbameinsvaldandi, undirflokkur 1A eða 1B eða 2. undirflokkur,

— stökkbreytandi, undirflokkur 1A eða 1B eða 2. undirflokkur,

— efni sem hefur eiturhrif á æxlun, undirflokkur 1A eða 1B eða 2. undirflokkur,

— húðnæmir, 1. undirflokkur,

— efni sem veldur alvarlegum augnskaða, 1. undirflokkur,

— öndunarfæranæmir, 1. undirflokkur,

— efni sem hefur bráð eiturhrif, 1. 2. eða 3. undirflokkur,

— efni sem hefur sértæk eiturhrif á marklíffæri, 1. eða 2. undirflokkur,

— eitrað fyrir líf í vatni með bráð og langvinn eiturhrif, 1. undirflokkur, á grundvelli viðeigandi staðlaðra prófana,

— sprengifimt,

— húðætandi, undirflokkar 1A, 1B eða 1C,

b) það hefur verið tilgreint sem forgangsefni samkvæmt tilskipun 2000/60/EB,

c) það telst vera innkirtlatruflandi efni,

d) það hefur taugaeiturhrif eða ónæmiseitrandi áhrif.

5.1.2. Virkt efni, að undanskildum örverum, skal ekki teljast vera áhættulítið ef það er þrávirkt (helmingunartími í jarðvegi er lengri en 60 dagar) eða ef lífþéttnistuðull þess er yfir 100.

Hins vegar getur virkt efni, sem kemur fyrir frá náttúrunnar hendi og hefur engan af eiginleikunum í a- til d- lið í lið 5.1.1, talist vera áhættulítið þótt það sé þrávirkt (helmingunartími í jarðvegi er lengri en 60 dagar) eða lífþéttnistuðull þess sé yfir 100.

5.1.3. Virkt efni, að undanskildum örverum, sem plöntur, dýr og aðrar lífverur gefa frá sér og nota til boðskipta, skal teljast vera áhættulítið ef það hefur engan af eiginleikunum í a- til d-lið í lið 5.1.1.

5.2. Örverur

5.2.1. Virkt efni sem er örvera getur talist vera áhættulítið nema það hafi, á grundvelli stofns, sýnt margþætt þol gegn sýkingalyfjum sem notuð eru í manna- eða dýralyf.

5.2.2. Bakúlóveiran skal teljast vera áhættulítil nema hún hafi, á grundvelli stofns, sýnt skaðleg áhrif á skordýr utan markhóps.“

_____

FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/855 **2017/EES/74/05**

frá 18. maí 2017

um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 að því er varðar skilyrði fyrir samþykki fyrir virka efninu díflúbensúróni (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 frá 21. október 2009 um setningu plöntuverndarvara á markað og um niðurfellingu á tilskipunum ráðsins 79/117/EBE og 91/414/EBE ([1]), einkum fyrsta valkosti í 3. mgr. 21. gr. og 2. mgr. 78. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Díflúbensúróni var bætt við sem virku efni í I. viðauka við tilskipun ráðsins 91/414/EBE ([2]) með tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2008/69/EB ([3]).

2) Virk efni sem eru á skrá í I. viðauka við tilskipun 91/414/EBE teljast samþykkt samkvæmt reglugerð (EB) nr. 1107/2009 og eru skráð í A-hluta viðaukans við framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 540/2011 ([4]).

3) Í samræmi við tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2010/39/ESB ([5]) bar umsækjandanum, sem lagði fram beiðni um að díflúbensúrón yrði fært á skrá í I. viðauka við tilskipun ráðsins 91/414/EBE, að leggja fram upplýsingar til staðfestingar að því er varðar hugsanlegt eiturefnafræðilegt mikilvægi óhreinindanna og umbrotsefnisins 4-klóranilíns (PCA).

4) Umsækjandinn lagði þessar upplýsingar fyrir skýrslugjafaraðildarríkið Svíþjóð innan þeirra tímamarka sem gefin voru til að leggja þær fram.

5) Svíþjóð lagði mat á upplýsingarnar sem umsækjandinn lagði fram. Svíþjóð lagði mat sitt fyrir önnur aðildarríki, framkvæmdastjórnina og Matvælaöryggisstofnun Evrópu, hér á eftir nefnd Matvælaöryggisstofnunin, 20. desember 2011 í formi viðbótar við drögin að matsskýrslunni.

6) Framkvæmdastjórnin hafði samráð við Matvælaöryggisstofnunina sem lagði fram niðurstöðu sína varðandi áhættumat á upplýsingum til staðfestingar fyrir díflúbensúrón 7. september 2012 ([6]). Matvælaöryggisstofnunin gerði umsækjanda grein fyrir sjónarmiðum sínum varðandi díflúbensúrón og framkvæmdastjórnin bauð umsækjandanum að leggja fram athugasemdir sínar um endurskoðunarskýrsluna. Aðildarríkin og framkvæmdastjórnin endurskoðuðu drögin að matsskýrslunni, viðbótina og niðurstöður Matvælaöryggisstofnunarinnar innan fastanefndarinnar um matvælaferlið og heilbrigði dýra og þeirri endurskoðun lauk 16. júlí 2013 með endurskoðunarskýrslu framkvæmdastjórnarinnar um díflúbensúrón.

7) Þótt niðurstöður erfðaeiturhrifarannsókna gefi til kynna að PCA valdi erfðaeiturhrifum í lífi og sé krabbameinsvaldandi efni komu hugsanleg erfðaeiturhrif og krabbameinsvaldandi eiginleikar ekki fram í rannsóknum með viðeigandi dýralíkani fyrir váhrif á menn af völdum díflúbensúróns og þar með fyrir PCA sem umbrotsefni og óhreinindi. Í ljósi upplýsinganna sem umsækjandinn lagði fram lítur framkvæmdastjórnin svo á að upplýsingunum, sem krafist var til staðfestingar, hafi verið komið til skila.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 128, 19.5.2017, bls. 10. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 195/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 309, 24.11.2009, bls. 1.

([2]) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2008/69/EB frá 1. júlí 2008 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE í því skyni að bæta við virku efnunum klófentesíni, díkamba, difenókónasóli, díflúbensúróni, ímasakíni, lenasíli, oxadíasóni, píklórami og pýriproxýfeni (Stjtíð. ESB L 172, 2.7.2008, bls. 9).

([3]) Tilskipun ráðsins 91/414/EBE frá 15. júlí 1991 um markaðssetningu plöntuvarnarefna (Stjtíð. EB L 230, 19.8.1991, bls. 1).

([4]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 540/2011 frá 25. maí 2011 um framkvæmd reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 að því er varðar skrána yfir samþykkt, virk efni (Stjtíð. ESB L 153, 11.6.2011, bls. 1).

([5]) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2010/39/ESB frá 22. júní 2010 um breytingu á I. viðauka við tilskipun ráðsins 91/414/EBE að því er varðar sértæk ákvæði í tengslum við virku efnin klófentesín, díflúbensúrón, lenasíl, oxadíasón, píklóram og pýriproxýfen (Stjtíð. ESB L 156, 23.6.2010, bls. 7).

([6]) Matvælaöryggisstofnun Evrópu, „Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of confirmatory data submitted for the active substance diflubenzuron“. *Tíðindi Matvælaöryggisstofnunar Evrópu* 2012 10(9), 2870. [26 bls.]. doi:10.2903/j.efsa.2012.2870. Aðgengilegt á Netinu: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

8) Í niðurstöðum sínum greindi Matvælaöryggisstofnunin hins vegar nýtt áhyggjuefni í tengslum við hugsanleg váhrif af völdum leifa PCA, að teknu tilliti til eiginleika PCA sem tengjast erfðaeiturhrifum sem hafa greinst á grundvelli upplýsinga til staðfestingar og að teknu tilliti til krabbameinsvaldandi eiginleika PCA og þess að viðmiðunarmörk fyrir viðunandi váhrif eru ekki fyrir hendi.

9) Framkvæmdastjórnin hóf endurskoðun á samþykki fyrir virka efninu díflúbensúróni. Framkvæmdastjórnin taldi, í ljósi nýrrar vísinda- og tækniþekkingar sem lýst er hér að framan, að vísbendingar væru um að samþykki fyrir virka efninu díflúbensúróni uppfyllti ekki lengur viðmiðanir fyrir samþykki, sem kveðið er á um í 4. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009, að því er varðar hugsanleg skaðleg áhrif þess á heilbrigði manna vegna váhrifa af völdum leifa PCA. Hún bauð umsækjandanum að leggja fram upplýsingar að því er varðar hugsanleg váhrif af völdum leifa PCA og, ef váhrif eru staðfest, athuganir á hugsanlegu mikilvægi í eiturefnafræðilegu tilliti.

10) Umsækjandinn lagði þessar upplýsingar fyrir Svíþjóð innan þeirra tímamarka sem gefin voru til að leggja þær fram.

11) Svíþjóð lagði mat á upplýsingarnar sem umsækjandinn lagði fram. Hinn 23. júlí 2014 lagði Svíþjóð mat sitt fyrir önnur aðildarríki, framkvæmdastjórnina og Matvælaöryggisstofnunina í formi viðbótar við drögin að matsskýrslunni.

12) Framkvæmdastjórnin hafði samráð við Matvælaöryggisstofnunina sem lagði fram niðurstöðu sína varðandi áhættumatið á gögnum sem voru lögð fram vegna endurskoðunar á samþykki fyrir díflúbensúróni 11. desember 2015 ([1]). Matvælaöryggisstofnunin gerði umsækjandanum grein fyrir sínum sjónarmiðum varðandi díflúbensúrón.

13) Framkvæmdastjórnin telur að upplýsingarnar, sem lagðar voru fram í endurskoðunarferlinu, sýni ekki fram á að áhættan vegna hugsanlegra váhrifa á neytendur af völdum leifa PCA sé viðunandi. Einkum hefur verið sýnt fram á tilvist PCA í efnaskiptaferli sumra plantna og búfjár og ekki var unnt að útiloka hana í öðrum. Enn fremur bentu rannsóknir til verulegrar umbreytingar á leifum díflúbensúróns í PCA við skilyrði, sem eru svipuð eða eins og við dauðhreinsun matvæla, og ekki er unnt að útiloka slíka umbreytingu fyrir vinnsluaðferðir á heimilum.

14) Með tilliti til eiginleika PCA sem tengjast erfðaeiturhrifum og krabbameinsvaldandi eiginleikum og þess að viðmiðunarmörk fyrir viðunandi váhrif eru ekki fyrir hendi var ekki sýnt fram á að váhrif á neytendur af völdum PCA sem leifar, eftir notkun í samræmi við góðar starfsvenjur við plöntuvernd, hafi engin skaðleg áhrif. Þar eð ekki er unnt að fastsetja eiturefnafræðileg viðmiðunargildi fyrir PCA og þar af leiðandi ekki unnt að greina örugg gildi leifa ætti að koma í veg fyrir hvers konar váhrif á neytendur af völdum PCA.

15) Framkvæmdastjórnin gaf umsækjandanum færi á að leggja fram athugasemdir sínar varðandi endurskoðunarskýrsluna. Athugasemdir umsækjandans drógu ekki úr áhyggjum varðandi öryggi neytenda vegna váhrifa af völdum PCA.

16) Aðildarríkin og framkvæmdastjórnin endurskoðuðu drögin að matsskýrslunni, viðbótina og niðurstöður Matvælaöryggisstofnunarinnar innan fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður og þeirri endurskoðun lauk 23. mars 2017 með endurskoðunarskýrslu framkvæmdastjórnarinnar um díflúbensúrón.

17) Framkvæmdastjórnin komst að þeirri niðurstöðu að ekki sé unnt að útiloka váhrif á neytendur af völdum PCA nema með því að koma á frekari takmörkunum. Einkum ætti að takmarka notkun á díflúbensúróni við óætar plöntur og plöntur sem eru meðhöndlaðar með díflúbensúróni ættu ekki að fara inn í matvæla- og fóðurferlið. Til að minnka váhrif á neytendur af völdum PCA er því rétt að breyta skilyrðum fyrir notkun á díflúbensúróni.

18) Því ætti að breyta viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 til samræmis við það.

19) Gefa ætti aðildarríkjunum tíma til að breyta leyfum fyrir plöntuverndarvörum sem innihalda díflúbensúrón eða afturkalla þau.

20) Ef aðildarríki veita einhvern frest í samræmi við 46. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009 að því er varðar plöntuverndarvörur sem innihalda díflúbensúrón ætti sá frestur að renna út eigi síðar en 15 mánuðum eftir gildistökudag þessarar reglugerðar.

([1]) Matvælaöryggisstofnun Evrópu, „Conclusion on the peer review on the review of the approval of the active substance diflubenzuron regarding the metabolite PCA.“ *Tíðindi Matvælaöryggisstofnunar Evrópu* 2015 13(8), 4222. [30 bls.]. doi:10.2903/j.efsa.2015.4222. Aðgengilegt á Netinu: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

21) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Breyting á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011

Í stað textans í sjöunda dálki, „Sértæk ákvæði“, í 174. færslu um díflúbensúrón í A-hluta viðaukans við framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 komi eftirfarandi texti:

„Einungis má leyfa að efnið sé notað sem skordýraeyðir fyrir óætar plöntur.

Við framkvæmd samræmdu meginreglnanna, eins og um getur í 6. mgr. 29. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009, skal taka tillit til niðurstaðnanna í endurskoðunarskýrslunni um díflúbensúrón, einkum í I. og II. viðbæti við hana, eins og fastanefndin um plöntur, dýr, matvæli og fóður breytti henni 23. mars 2017.

Í þessu heildarmati skulu aðildarríkin gefa sérstakan gaum að:

— forskrift fyrir tæknilega efnið, sem framleitt er sem verslunarvara, sem skal staðfest og studd viðeigandi greiningargögnum. Prófunarefnið sem er notað í málsskjölunum um eiturhrif skal borið saman við þessa forskrift fyrir tæknilega efnið og sannprófað,

— vernd lagarlífvera, landlífvera og liðdýra utan markhóps, þ.m.t. býflugur,

— hugsanleg ótilætluð váhrif á nytjaplöntur til matvæla- og fóðurframleiðslu af völdum díflúbensúróns frá notkun á óætar plöntur (t.d. með úðareki),

— vernd starfsmanna, íbúa og vegfarenda.

Aðildarríkin skulu tryggja að nytjaplöntur sem eru meðhöndlaðar með díflúbensúróni fari ekki inn í matvæla- og fóðurferlið.

Í notkunarskilyrðum skulu felast fullnægjandi ráðstafanir til að draga úr áhættu, eftir því sem við á.“

2. gr.

Umbreytingarráðstafanir

Aðildarríkin skulu, í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1107/2009 og ef nauðsyn krefur, breyta áður útgefnum leyfum fyrir plöntuverndarvörum, sem innihalda díflúbensúrón sem virkt efni, eða afturkalla þau eigi síðar en 8. september 2017.

3. gr.

Frestir

Allir frestir, sem aðildarríki veita í samræmi við 46. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009, skulu vera eins stuttir og unnt er og skulu renna út eigi síðar en 8. september 2018.

4. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 18. maí 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/856 **2017/EES/74/06**

frá 18. maí 2017

um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 að því er varðar skilyrði fyrir samþykki fyrir virka efninu flúroxýpýri (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 frá 21. október 2009 um setningu plöntuverndarvara á markað og um niðurfellingu á tilskipunum ráðsins 79/117/EBE og 91/414/EBE ([1]), einkum öðrum valkosti í 3. mgr. 21. gr. og 2. mgr. 78. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Með framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 736/2011 ([2]) var flúroxýpýr samþykkt sem virkt efni í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1107/2009 með tilteknum skilyrðum þar sem þess er krafist að viðkomandi aðildarríki sjái til þess að umsækjandinn, sem lagði fram beiðni um að flúroxýpýr yrði samþykkt, legði fram frekari upplýsingar til staðfestingar að því er varðar sex þætti, þ. á m. varðandi mikilvægi óhreinindanna í tækniforskriftinni.

2) Hinn 25. júní 2012 og 5. september 2013 lagði umsækjandinn viðbótarupplýsingar fyrir skýrslugjafaraðildarríkið Írland, innan þeirra tímamarka sem gefin voru til að leggja þær fram, vegna krafna um gögn til staðfestingar.

3) Írland lagði mat á viðbótarupplýsingarnar sem umsækjandinn lagði fram. Írland lagði mat sitt fyrir önnur aðildarríki, framkvæmdastjórnina og Matvælaöryggisstofnun Evrópu, hér á eftir nefnd Matvælaöryggisstofnunin, 22. desember 2014 í formi viðbótar við drögin að matsskýrslunni og bauð þeim að gera athugasemdir við matið.

4) Matvælaöryggisstofnunin gaf út tæknilega skýrslu með samantekt á niðurstöðu þessa samráðsferlis um flúroxýpýr 22. júlí 2015 ([3]).

5) Aðildarríkin og framkvæmdastjórnin endurskoðuðu drögin að matsskýrslunni, viðbótina og tæknilegu skýrsluna innan fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður og þeirri endurskoðun lauk 23. mars 2017 með endurskoðunarskýrslu framkvæmdastjórnarinnar um flúroxýpýr.

6) Framkvæmdastjórnin gaf umsækjandanum færi á að leggja fram athugasemdir sínar varðandi endurskoðunarskýrslu framkvæmdastjórnarinnar um flúroxýpýr.

7) N-metýl-2-pýrrólídón er flokkað í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 ([4]) sem efni sem hefur eiturhrif á æxlun í undirflokki 1B og eru almenn styrkleikamörk þess 0,3%. Afar ólíklegt er að N-metýl-2-pýrrólídón í tæknilega efninu í magni sem er undir 3 g/kg skapi áhættu fyrir neytendur. Því hefur framkvæmdastjórnin komist að þeirri niðurstöðu að framlagðar viðbótarupplýsingar hafi sýnt að fastsetja ætti hámarksgildi fyrir óhreinindi N-metýl-2-pýrrólídóns, sem skipta máli í eiturefnafræðilegu tilliti, undir 3 g/kg (< 0,3%) í tæknilega efninu.

8) Til þess að tryggja víðtæka vernd fyrir neytendur er því rétt að fastsetja hámarksgildi fyrir þessi óhreinindi í virka efninu sem framleitt er sem verslunarvara.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 128, 19.5.2017, bls. 14. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 195/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 309, 24.11.2009, bls. 1.

([2]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 736/2011 frá 26. júlí 2011 um samþykki fyrir virka efninu flúroxýpýri, í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 um setningu plöntuverndarvara á markað, og um breytingu á viðaukanum við framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 540/2011 (Stjtíð. ESB L 195, 27.7.2011, bls. 37).

([3]) EFSA (Matvælaöryggisstofnun Evrópu), 2015. Technical report on the outcome of the consultation with Member States, the applicant and EFSA on the pesticide risk assessment for fluroxypyr in light of confirmatory data (Tæknileg skýrsla um niðurstöður samráðs við aðildarríkin, umsækjandann og Matvælaöryggisstofnun Evrópu um áhættumat á varnarefnum að því er varðar flúroxýpýr í ljósi gagna til staðfestingar). EFSA supporting publication 2015:EN-857. 43 bls.

([4]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

9) Því ætti að breyta viðaukanum við framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 540/2011 ([1]) til samræmis við það.

10) Gefa ætti aðildarríkjunum nægan tíma til að breyta leyfum fyrir plöntuverndarvörum sem innihalda flúroxýpýr eða afturkalla þau.

11) Ef aðildarríki veita einhvern frest í samræmi við 46. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009 að því er varðar plöntuverndarvörur sem innihalda flúroxýpýr ætti þessi frestur að renna út eigi síðar en 8. september 2018.

12) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Breyting á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011

Viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

Umbreytingarráðstafanir

Aðildarríkin skulu, í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1107/2009 og ef nauðsyn krefur, breyta áður útgefnum leyfum fyrir plöntuvarnarvörum, sem innihalda flúroxýpýr sem virkt efni, eða afturkalla þau eigi síðar en 8. september 2017.

3. gr.

Frestir

Allir frestir, sem aðildarríki veita í samræmi við 46. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009, skulu vera eins stuttir og unnt er og skulu renna út eigi síðar en 8. september 2018.

4. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 18. maí 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

———

([1]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 540/2011 frá 25. maí 2011 um framkvæmd reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1107/2009 að því er varðar skrána yfir samþykkt, virk efni (Stjtíð ESB L 153, 11.6.2011, bls. 1).

VIÐAUKI

Í stað dálksins „Hreinleiki“ í 9. línu, flúroxýpýr, í B-hluta viðaukans við framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 komi eftirfarandi:

„≥ 950 g/kg (flúroxýpýrmeptýl)

Eftirfarandi framleiðsluóhreinindi eru varasöm í eiturefnafræðilegu tilliti og magn þeirra í tæknilega efninu má ekki vera meira en:

N-metýl-2-pýrrólídón: < 3 g/kg“

Í stað dálksins „Sértæk ákvæði“ í 9. línu, flúroxýpýr, í B-hluta viðaukans við framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 540/2011 komi eftirfarandi:

„A-HLUTI

Einungis má leyfa að efnið sé notað sem illgresiseyðir.

B-HLUTI

Við framkvæmd samræmdu meginreglnanna, sem um getur í 6. mgr. 29. gr. reglugerðar (EB) nr. 1107/2009, skal taka tillit til niðurstaðnanna í endurskoðunarskýrslunni um flúroxýpýr, einkum í I. og II. viðbæti við hana, í lokagerð fastanefndarinnar um plöntur, dýr, matvæli og fóður frá 23. mars 2017.

Í þessu heildarmati skulu aðildarríkin gefa sérstakan gaum að:

— mögulegri mengun grunnvatns af völdum umbrotsefnisins flúroxýpýrpýridínóls þegar virka efnið er notað á svæðum með basískan eða viðkvæman jarðveg eða sem eru viðkvæm að því er varðar loftslagsskilyrði,

— áhættu fyrir lagarlífverur.

Í skilyrðunum fyrir leyfi skulu vera ráðstafanir til að draga úr áhættu, eftir því sem við á.“

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/1224 2017/EES/74/07

frá 6. júlí 2017

um breytingu á V. viðauka við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1223/2009 um snyrtivörur (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1223/2009 frá 30. nóvember 2009 um snyrtivörur ([1]), einkum 1. mgr. 31. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Efnið 2-metýl-2H-ísóþíasól-3-ón, sem hefur fengið heitið metýlísóþíasólínón í alþjóðlegu nafnakerfi fyrir innihaldsefni snyrtivara, CAS-númer 2682-20-4, er sem stendur leyft með færslu 57 í V. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1223/2009 sem rotvarnarefni í snyrtivörur, sem á að skola burt eftir notkun, í styrk sem nemur allt að 0,01% massahlutfalli (100 milljónarhlutar).

2) Vísindanefndin um öryggi neytenda samþykkti álit 15. desember 2015 um öryggi metýlísóþíasólínóns ([2]). Vísindanefndin um öryggi neytenda komst að þeirri niðurstöðu, að því er varðar snyrtivörur sem á að skola burt eftir notkun, að metýlísóþíasólínón, í styrk sem nemur allt að 0,0015% (15 milljónarhlutar), teljist vera öruggt fyrir neytendur með tilliti til örvunar snertiofnæmis.

3) Í ljósi þessa álits vísindanefndarinnar um öryggi neytenda er mikilvægt að fjalla um aukna tíðni ofnæmis, sem metýlísóþíasólínón kallar fram, og því ætti að takmarka þetta efni enn frekar í vörum sem á að skola burt eftir notkun.

4) Því ætti að breyta reglugerð (EB) nr. 1223/2009 til samræmis við það.

5) Gefa ætti iðnaðinum hæfilegan frest til að gera nauðsynlegar aðlaganir á efnasamsetningum með það í huga að setja þær á markað og til að taka vörur, sem uppfylla ekki kröfur, af markaði.

6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um snyrtivörur.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Ákvæðum V. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1223/2009 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

Frá 27. janúar 2018 skal einungis setja snyrtivörur, sem eru í samræmi við þessa reglugerð, á markað í Sambandinu.

Frá 27. apríl 2018 skal einungis bjóða snyrtivörur, sem eru í samræmi við þessa reglugerð, fram á markaði í Sambandinu.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 174, 7.7.2017, bls. 16. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 196/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 342, 22.12.2009, bls. 59.

([2]) SCCS/1557/15 (framlagning III)

3. gr.

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

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

Gjört í Brussel 6. júlí 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

———

VIÐAUKI

Í stað færslu 57 í V. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1223/2009 komi eftirfarandi:

Tilvísunar-númer	Auðkenning efna				Skilyrði			Orðalag notkunar-skilyrða og varnaðarorða
	Efnaheiti/INN	Heiti í skrá yfir almenn heiti innihaldsefna	CAS-númer	EB-númer	Vörutegund, líkamshlutar	Hámarksstyrkur í efnablöndu sem er tilbúin til notkunar	Annað	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
„57	2-metýl-2H-ísóþíasól-3-ón	Methylisothiazolinone (*)	2682-20-4	220-239-6	Vörur sem á að skola burt eftir notkun	0,0015%		

(*) Metýlísóþíasólínón í blöndu með metýlklórísóþíasólínóni er einnig reglufest í færslu 39 í V. viðauka. Færslurnar tvær útiloka hvor aðra: notkun á blöndu metýlklórísóþíasólínóns (og) metýlísóþíasólínóns er ósamrýmanleg við notkun á metýlísóþíasólínóni einu og sér í sömu vöru.“

FRAMSELD REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/254 2017/EES/74/08

frá 30. nóvember 2016

um breytingu á framseldu reglugerðunum (ESB) nr. 1059/2010, (ESB) nr. 1060/2010, (ESB) nr. 1061/2010, (ESB) nr. 1062/2010, (ESB) nr. 626/2011, (ESB) nr. 392/2012, (ESB) nr. 874/2012, (ESB) nr. 665/2013, (ESB) nr. 811/2013, (ESB) nr. 812/2013, (ESB) nr. 65/2014, (ESB) nr. 1254/2014, (ESB) 2015/1094, (ESB) 2015/1186 og (ESB) 2015/1187 að því er varðar beitingu vikmarka í sannprófunaraðferðum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB frá 19. maí 2010 um merkingar og staðlaðar vörulýsingar á orkutengdum vörum er greina frá notkun þeirra á orku og öðrum auðföngum ([1]), einkum 1. mgr. 10. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Reynslan sem fengist hefur af framkvæmd framseldra reglugerða framkvæmdastjórnarinnar, sem voru samþykktar á grundvelli tilskipunar 2010/30/ESB, hefur leitt í ljós að vikmörk sannprófana, sem mælt er fyrir um í framseldu reglugerðunum og eru aðeins ætluð til notkunar af markaðseftirlitsyfirvöldum, hafa verið notuð af sumum birgjum til að ákvarða gildin, sem gefa á upp í tæknigögnum, eða til að túlka þau, með það fyrir augum að ná fram betri flokkun orkumerkingar eða til að gefa til kynna, með öðrum leiðum, betri frammistöðu vara sinna.

2) Vikmörk sannprófana eru hönnuð til að gera ráð fyrir frávikum sem koma fram í mælingum við sannprófanir og eru vegna mismunar í mælibúnaði sem birgjar og eftirlitsyfirvöld nota í Sambandinu. Birgjar ættu ekki að nota vikmörk sannprófana til að ákvarða gildi í tæknigögnum eða til að túlka þau, með það að markmiði að ná fram betri flokkun orkumerkingar eða til að gefa til kynna betri frammistöðu en hefur verið mæld og reiknuð út í raun. Mæliþættir, sem birgir gefur upp eða birtir, ættu ekki að vera hagstæðari birginum en gildin sem er að finna í tæknigögnunum.

3) Til að tryggja sanngjarna samkeppni, til að gera orkusparnaðinn, sem reglugerðirnar voru hannaðar til að ná fram, að veruleika og til að veita neytendum nákvæmar upplýsingar um orkunýtni og virkni vara, ætti að koma fram, með skýrum hætti, að vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í framseldu gerðunum, eru aðeins til notkunar af hálfu yfirvalda aðildarríkis í þeim tilgangi að sannreyna að farið sé að tilskildum ákvæðum.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 38, 15.2.2017, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 197/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 153, 18.6.2010, bls. 1.

4) Því ætti að breyta framseldum reglugerðum framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1059/2010 ([1]), (ESB) nr. 1060/2010 ([2]), (ESB) nr. 1061/2010 ([3]), (ESB) nr. 1062/2010 ([4]), (ESB) nr. 626/2011 ([5]), (ESB) nr. 392/2012 ([6]), (ESB) nr. 874/2012 ([7]), (ESB) nr. 665/2013 ([8]), (ESB) nr. 811/2013 ([9]), (ESB) nr. 812/2013 ([10]), (ESB) nr. 65/2014 ([11]), (ESB) nr. 1254/2014 ([12]), (ESB) 2015/1094 ([13]), (ESB) 2015/1186 ([14]) og (ESB) 2015/1187 ([15]) til samræmis við það.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 1059/2010

Ákvæðum V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1059/2010 er breytt í samræmi við I. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

2. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 1060/2010

Ákvæðum VII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1060/2010 er breytt í samræmi við II. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

([1]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1059/2010 frá 28. september 2010 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar uppþvottavéla til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 314, 30.11.2010, bls. 1).

([2]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1060/2010 frá 28. september 2010 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar kælitækja til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 314, 30.11.2010, bls. 17).

([3]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1061/2010 frá 28. september 2010 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar þvottavéla til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 314, 30.11.2010, bls. 47).

([4]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1062/2010 frá 28. september 2010 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar sjónvarpa (Stjtíð. ESB L 314, 30.11.2010, bls. 64).

([5]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 626/2011 frá 4. maí 2011 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar loftræstisamstæðna (Stjtíð. ESB L 178, 6.7.2011, bls. 1).

([6]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 392/2012 frá 1. mars 2012 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar þurrkara til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 123, 9.5.2012, bls. 1).

([7]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 874/2012 frá 12. júlí 2012 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar rafmagnsljósapera og lampa (Stjtíð. ESB L 258, 26.9.2012, bls. 1).

([8]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 665/2013 frá 3. maí 2013 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar ryksugna (Stjtíð. ESB L 192, 13.7.2013, bls. 1).

([9]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 811/2013 frá 18. febrúar 2013 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar hitara fyrir rými, sambyggðra hitara, pakka með hitara fyrir rými, hitastýringu og búnaði sem nýtir sólarorku og pakka með sambyggðum hitara, hitastýringu og búnaði sem nýtir sólarorku (Stjtíð. ESB L 239, 6.9.2013, bls. 1).

([10]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 812/2013 frá 18. febrúar 2013 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar vatnshitara, geymslutanka fyrir heitt vatn og pakka með vatnshitara og búnaði sem nýtir sólarorku (Stjtíð. ESB L 239, 6.9.2013, bls. 83).

([11]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 65/2014 frá 1. október 2013 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar bakaraofna og gufugleypa til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 29, 31.1.2014, bls. 1).

([12]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1254/2014 frá 11. júlí 2014 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar loftræstieininga fyrir íbúðarhúsnæði (Stjtíð. ESB L 337, 25.11.2014, bls. 27).

([13]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1094 frá 5. maí 2015 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar kæli- eða frystiskápa sem notaðir eru í atvinnuskyni (Stjtíð. ESB L 177, 8.7.2015, bls. 2).

([14]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1186 frá 24. apríl 2015 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar staðbundinna rýmishitara (Stjtíð. ESB L 193, 21.7.2015, bls. 20).

([15]) Framseld reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1187 frá 27. apríl 2015 um viðbætur við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/30/ESB að því er varðar orkumerkingar katla fyrir eldsneyti í föstu formi og pakka með kötlum fyrir eldsneyti í föstu formi, viðbótarhiturum, hitastýringu og búnaði sem nýtir sólarorku (Stjtíð. ESB L 193, 21.7.2015, bls. 43).

3. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 1061/2010

Ákvæðum V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1061/2010 er breytt í samræmi við III. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

4. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 1062/2010

Ákvæðum VII. og VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1062/2010 er breytt í samræmi við IV. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

5. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 626/2011

Ákvæðum VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 626/2011 er breytt í samræmi við V. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

6. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 392/2012

Ákvæðum V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 392/2012 er breytt í samræmi við VI. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

7. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 874/2012

Ákvæðum V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 874/2012 er breytt í samræmi við VII. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

8. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 665/2013

Ákvæðum VII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 665/2013 er breytt í samræmi við VIII. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

9. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 811/2013

Ákvæðum VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 811/2013 er breytt í samræmi við IX. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

10. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 812/2013

Ákvæðum IX. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 812/2013 er breytt í samræmi við X. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

11. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 65/2014

Ákvæðum VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 65/2014 er breytt í samræmi við XI. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

12. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) nr. 1254/2014

Ákvæðum IX. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1254/2014 er breytt í samræmi við XII. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

13. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) 2015/1094

Ákvæðum X. viðauka við framselda reglugerð (ESB) 2015/1094 er breytt í samræmi við XIII. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

14. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) 2015/1186

Ákvæðum IX. viðauka við framselda reglugerð (ESB) 2015/1186 er breytt í samræmi við XIV. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

15. gr.

Breytingar á framseldri reglugerð (ESB) 2015/1187

Ákvæðum X. viðauka við framselda reglugerð (ESB) 2015/1187 er breytt í samræmi við XV. viðauka við þessa framseldu reglugerð.

16. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 30. nóvember 2016.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

I. VIÐAUKI

Breytingar á V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1059/2010

Í stað V. viðauka komi eftirfarandi:

„V. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og á vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir uppþvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir uppþvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu tafarlaust gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkjanna skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árleg orkunotkun (AE_C)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið AE_C en sem nemur 10%.
Vatnsnotkun (W_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið W_t en sem nemur 10%.
Þurrkunarafkastastuðull (I_D)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið I_D en sem nemur 19%.
Orkunotkun (E_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 10%. Ef velja þarf þrjár viðbótareiningar skal meðaltal ákvörðuðu gildanna fyrir þessar þrjár einingar ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t. en sem nemur 6%.
Tímalengd kerfis (T_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_t en sem nemur 10%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði og þegar hann er í reiðuham eftir notkun (P_o og P_l)	Ákvarðað gildi aflþarfar P_o og P_l, sem er yfir 1,0 W, skal ekki vera hærra en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 10%. Ákvarðað gildi aflþarfar P_o og P_l, sem er jafnt og eða lægra en 1,0 W, skal ekki vera hærra en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Tímalengd í reiðuham eftir notkun (T_l)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_l en sem nemur 10%.
Hávaðamengun sem berst í lofti	Ákvarðað gildi skal samsvara yfirlýsta gildinu.“

II. VIÐAUKI

Breytingar á VII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1060/2010

Í stað VII. viðauka komi eftirfarandi:

„VII. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og á vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir kælitækja til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir kælitækja til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VI. og VIII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Brúttórúmmál	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3% eða 1 lítra, hvort heldur er hærra gildið.
Rúmmál geymslutanks	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3% eða 1 lítra, hvort heldur er hærra gildið. Ef notandi getur stillt hlutfallslega rúmmál búrhólfsins og kælihólfsins skal mæla rúmmálið þegar búrhólfið er stillt á minnsta rúmmál.
Frystigeta	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Orkunotkun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið (E_{24h}) en sem nemur 10%.
Rakastig í vínkælum	Ákvarðað gildi fyrir rakastig sem kemur fram við prófun skal ekki fara meira en 10% yfir það bil sem er gefið upp í hvaða átt sem er.
Hávaðamengun sem berst í lofti	Ákvarðað gildi skal samsvara yfirlýsta gildinu.“

III. VIÐAUKI

Breytingar á V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1061/2010

Í stað V. viðauka komi eftirfarandi:

„V. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar, sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir þvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir þvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkjanna skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árleg orkunotkun (AE_C)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið AE_C en sem nemur 10%.
Orkunotkun (E_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 10%. Ef velja þarf þrjár viðbótareiningar skal meðaltal ákvörðuðu gildanna fyrir þessar þrjár einingar ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 6%.
Tímalengd kerfis (T_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_t en sem nemur 10%.
Vatnsnotkun (W_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið W_t en sem nemur 10%.
Rakainnihald sem eftir er (D)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið D en sem nemur 10%.
Snúningshraði	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði og þegar hann er í reiðuham eftir notkun (P_o og P_l)	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru yfir 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 10%. Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru jöfn og eða lægri en 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Tímalengd reiðuhams eftir notkun (T_l)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_l en sem nemur 10%.
Hávaðamengun sem berst í lofti	Ákvarðað gildi skal samsvara yfirlýsta gildinu.“

IV. VIÐAUKI

Breytingar á VII. og VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1062/2010

1) Ákvæðum VII. viðauka er breytt sem hér segir:

a) Ákvæði iv. liðar a-liðar í 2. hluta falli brott.

b) Ákvæði 3. hluta falli brott.

c) Í 4. hluta komi eftirfarandi í stað fyrirsagnarinnar:

„4. **Mælingar á hlutfalli hámarksljóma sem um getur í töflu 2 í VIII. viðauka**“.

2) Í stað VIII. viðauka komi eftirfarandi:

„VIII. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 2.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 2.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 2, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 2

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Aflþörf þegar kveikt er á tæki	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 7%.
Aflþörf í reiðuham/þegar slökkt er á tæki	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.
Hlutfall hámarksljóma	Ákvarðað gildi skal ekki vera undir 60% af hámarksljóma sjónvarpsins í sínu bjartasta ástandi þegar kveikt er á því.“

V. VIÐAUKI

Breytingar á VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 626/2011

Í stað VIII. viðauka komi eftirfarandi:

„VIII. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldrar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundið orkunýtnihlutfall (SEER)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Árstíðabundinn nýtnistuðull (SCOP)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Aflþörf í reiðuham	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Orkunýtnihlutfall (EER_{rated})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Nýtnistuðull (COP_{rated})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Hljóðaflsstig	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2 dB (A).“

VI. VIÐAUKI

Breytingar á V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 392/2012

Í stað V. viðauka komi eftirfarandi:

„V. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir þurrkara til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir þurrkara til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkjanna skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Vegin árleg orkunotkun (AE_C)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið AE_C en sem nemur 6%.
Vegin orkunotkun (E_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 6%.
Vegin þéttingarafköst (C_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið C_t en sem nemur 6%.
Vegin tímalengd kerfis (T_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_t en sem nemur 6%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði og þegar hann er í reiðuham eftir notkun (P_o og P_l)	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru yfir 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 6%. Ákvarðað gildi aflþarfar P_o og P_l, sem er jafnt og eða lægra en 1,0 W, skal ekki vera hærra en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Tímalengd reiðuhams eftir notkun (T_l)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_l en sem nemur 6%.
Hljóðaflsstig, L_{WA}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið L_{WA}.“

VII. VIÐAUKI

Breytingar á V. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 874/2012

Í stað V. viðauka komi eftirfarandi:

„V. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1. SANNPRÓFUNARAÐFERÐ FYRIR RAFMAGNSLJÓSAPERUR OG LJÓSDÍÓÐUEININGAR MARKAÐSSETTAR SEM STAKAR VÖRUR

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa sýni a.m.k. 20 ljósapera af sömu tegund, frá sama birgi, sem hafa verið fengnar, ef mögulegt er, í jöfnum hlutföllum frá fjórum aðilum sem valdir voru af handahófi.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) við prófun á einingum tegundarinnar sé meðaltal ákvörðuðu gildanna (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem reiknuð eru út frá þessum mælingum) innan viðkomandi vikmarka sem nema 10%.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a-, b- eða c-lið 2. liðar, fást ekki skal tegundin ekki teljast uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, sem endurspegla almennt viðurkenndar mæliaðferðir sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita 10% vikmörkum við sannprófun og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst í er í 1.–4. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

2. SANNPRÓFUNARAÐFERÐ FYRIR LAMPA SEM ÆTLUNIN ER AÐ MARKAÐSSETJA EÐA ERU MARKAÐSSETTIR FYRIR ENDANLEGA NOTENDUR

Lampinn telst uppfylla kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, ef honum fylgja tilskildar vöruupplýsingar, ef fullyrt er að hann sé samhæfður öllum orkunýtniflokkum ljósapera, sem hann er samhæfður við, og ef hann telst vera samhæfður orkunýtniflokkum ljósapera, þegar nýjustu og fullkomnustu aðferðum og viðmiðunum við mat á samhæfi er beitt, sem fullyrt er að hann sé samhæfður við, samkvæmt a- og b-lið IV. liðar 2. liðar í 2. hluta I. viðauka.“

———

VIII. VIÐAUKI

Breytingar á VII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 665/2013

Í stað VII. viðauka komi eftirfarandi:

„VII. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 4.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir ryksugna, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum ryksugna sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 4.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir ryksugna, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og útreikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VI. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 4, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 4

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árleg orkunotkun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Rykupptaka á teppi	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,03.
Rykupptaka á hörðu gólfefni	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,03.
Ryklosun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 15%.
Hljóðaflsstig	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið.“

IX. VIÐAUKI

Breytingar á VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 811/2013

Í stað VIII. viðauka komi eftirfarandi:

„VIII. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 16.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldrar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 16.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 16, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 16

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Orkunýtni rýmishitunar, η_s	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Orkunýtni vatnshitunar, η_{wh}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Hljóðaflsstig	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2 dB (A).
Flokkur hitastýringar	Flokkur hitastýringar er í samræmi við uppgefinn flokk einingarinnar.
Orkunýtni sólargleypis, η_{col}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Fast tap, S	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Aukaraforkunotkun, Q_{aux}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

X. VIÐAUKI

Breytingar á IX. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 812/2013

Í stað IX. viðauka komi eftirfarandi:

„IX. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 9.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar aðrar sambærilegar tegundir vatnshitara, geymslutanka fyrir heitt vatn, búnaðar sem nýtir sólarorku eða pakka með vatnshitara og búnaði sem nýtir sólarorku, ekki uppfylla kröfurnar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri sambærilegum tegundum.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 9.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar aðrar sambærilegar tegundir vatnshitara, geymslutanka fyrir heitt vatn, búnaðar sem nýtir sólarorku eða pakka með vatnshitara og búnaði sem nýtir sólarorku, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VII. og VIII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 9, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 9

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Dagleg raforkunotkun, Q_{elec}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Hljóðaflsstig, L_{WA}, inni og/eða úti	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2 dB.
Dagleg eldsneytisnotkun, Q_{fuel}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg eldsneytisnotkun með snjallstýringu, $Q_{fuel,week,smart}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg raforkunotkun með snjallstýringu, $Q_{elec,week,smart}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg eldsneytisnotkun án snjallstýringar, $Q_{fuel,week}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg raforkunotkun án snjallstýringar, $Q_{elec,week}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Rúmmál, V	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2%.
Ljósopsflatarmál sólargleypis, A_{sol}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2%.
Aflþörf dælu, *solpump*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3%.
Aflþörf í reiðuham, *solstandby*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Fast tap, S	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

XI. VIÐAUKI

Breytingar á VIII. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 65/2014

Í stað VIII. viðauka komi eftirfarandi:

„VIII. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 6.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 6.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 6, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 6

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Massi bakarofns, M	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið M en sem nemur 5%.
Rúmmál hólfs í bakarofni, V	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið V en sem nemur 5%.
$EC_{electric\ cavity}$, $EC_{gas\ cavity}$	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin $EC_{electric\ cavity}$ og $EC_{qas\ cavity}$ en sem nemur 5%.
W_{BEP}, W_L	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin W_{BEP} og W_L en sem nemur 5%.
Q_{BEP}, P_{BEP}	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera lægri en yfirlýstu gildin Q_{BEP} og P_{BEP} en sem nemur 5%.
Q_{max}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið Q_{max} en sem nemur 8%.
E_{middle}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið E_{middle} en sem nemur 5%.
GFE_{hood}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið GFE_{hood} en sem nemur 5%.
P_o, P_s	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_s skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_s en sem nemur 10%. Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l , sem eru jöfn og eða lægri en 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Hljóðaflsstig, L_{WA}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið L_{WA}.“

XII. VIÐAUKI

Breytingar á IX. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 1254/2014

Í stað IX. viðauka komi eftirfarandi:

„IX. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið, fást ekki telst tegundin og allar aðrar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri sambærilegum tegundum.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar aðrar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VIII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
SPI	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en 1,07 sinnum yfirlýst gildi.
Varmanýtni loftræstieiningar fyrir íbúðarhúsnæði	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en 0,93 sinnum yfirlýst gildi.
Hljóðaflsstig	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið, að viðbættum 2 dB.“

XIII. VIÐAUKI

Breytingar á X. viðauka við framselda reglugerð (ESB) nr. 2015/1094

Í stað X. viðauka komi eftirfarandi:

„X. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 4.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allir sambærilegir kæli- eða frystiskápar, sem notaðir eru í atvinnuskyni og skráðir í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnunum.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 4.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allir sambærilegir kæli- eða frystiskápar, sem notaður eru í atvinnuskyni og skráðir í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VIII. og IX. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 4, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 4

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Nettórúmmál	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3%.
Orkunotkun (E_{24h})	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.“

XIV. VIÐAUKI

Breytingar á IX. viðauka við framselda reglugerð (ESB) 2015/1186

Í stað IX. viðauka komi eftirfarandi:

„IX. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 6. Einingin skal prófuð með eldsneyti sem hefur svipaða eiginleika og eldsneytið sem birgirinn notaði til að framkvæma mælingarnar sem lýst er í VIII. viðauka.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 6.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VIII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 6, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 6

Vikmörk við sannprófun

Mæliþáttur	Vikmörk við sannprófun
Orkunýtnistuðull	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.“

XV. VIÐAUKI

Breytingar á X. viðauka við framselda reglugerð (ESB) 2015/1187

Í stað X. viðauka komi eftirfarandi:

„X. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal birgirinn ekki nota þá sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin sem gefin eru upp í tæknigögnunum. Gildin og flokkarnir á merkimiðanum eða vöruupplýsingablaðinu skulu ekki vera hagstæðari fyrir birginn en tilkynnt gildi í tæknigögnunum.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari framseldu reglugerð, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum samkvæmt b-lið 5. gr. tilskipunar 2010/30/ESB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir birginn en samsvarandi gildi í prófunarskýrslunum, skv. iii. lið framangreindrar greinar, og

   b) gildin á merkimiðanum og vöruupplýsingablaðinu séu ekki hagstæðari fyrir birginn en yfirlýstu gildin og að tilgreindur orkunýtniflokkur sé ekki hagstæðari fyrir birginn en flokkurinn, sem ákvarðast af yfirlýstu gildunum, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 5. Einingin skal prófuð með eldsneyti sem hefur svipaða eiginleika og eldsneytið sem birgirinn notaði til að framkvæma mælingar í samræmi við VIII. viðauka.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum birgis.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 5.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum birgis sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar framseldu reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VIII. og IX. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 5, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 5

Vikmörk við sannprófun

Mæliþáttur	Vikmörk við sannprófun
Orkunýtnistuðull	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 6%.“

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2016/2282 **2017/EES/74/09**

frá 30. nóvember 2016

um breytingu á reglugerðum (EB) nr. 1275/2008, (EB) nr. 107/2009, (EB) nr. 278/2009, (EB) nr. 640/2009, (EB) nr. 641/2009, (EB) nr. 642/2009, (EB) nr. 643/2009, (ESB) nr. 1015/2010, (ESB) nr. 1016/2010, (ESB) nr. 327/2011, (ESB) nr. 206/2012, (ESB) nr. 547/2012, (ESB) nr. 932/2012, (ESB) nr. 617/2013, (ESB) nr. 666/2013, (ESB) nr. 813/2013, (ESB) nr. 814/2013, (ESB) nr. 66/2014, (ESB) nr. 548/2014, (ESB) nr. 1253/2014, (ESB) 2015/1095, (ESB) 2015/1185, (ESB) 2015/1188, (ESB) 2015/1189 og (ESB) 2016/2281 að því er varðar beitingu vikmarka í sannprófunaraðferðum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB frá 21. október 2009 um ramma til að setja fram kröfur varðandi visthönnun að því er varðar orkutengdar vörur ([1]), einkum 1. mgr. 15. gr.,

að höfðu samráði á samráðsvettvanginum um visthönnun,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Reynsla af framkvæmd reglugerða framkvæmdastjórnarinnar um kröfur varðandi visthönnun, sem samþykktar voru á grundvelli tilskipunar 2009/125/EB, hefur leitt í ljós að vikmörk sannprófana, sem mælt er fyrir um í framkvæmdarráðstöfunum og eru aðeins ætluð til notkunar af markaðseftirlitsyfirvöldum, hafa verið notuð af sumum framleiðendum og innflytjendum til að ákvarða gildin, sem gefa á upp í tæknigögnum, eða til að túlka þau, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu vara sinna.

2) Vikmörk sannprófana eru hönnuð til að gera ráð fyrir frávikum sem koma fram í mælingum við sannprófanir og eru vegna mismunar í mælibúnaði sem framleiðendur, innflytjendur og eftirlitsyfirvöld nota í Sambandinu. Framleiðendur eða innflytjendur ættu ekki að nota vikmörk sannprófana til að ákvarða gildi í tæknigögnum eða til að túlka þau gildi með það að markmiði að ná fram samræmi við visthönnunarreglur eða til að sýna fram á betri frammistöðu en hefur verið mæld og reiknuð út í raun. Mæliþættir, sem framleiðandi eða innflytjandi gefur upp eða birtir, ættu ekki að vera hagstæðari framleiðandanum eða innflytjandanum en gildin sem er að finna í tæknigögnunum.

3) Til að tryggja sanngjarna samkeppni, til að gera orkusparnaðinn, sem reglugerðirnar voru hannaðar til að ná fram, að veruleika og til að veita neytendum nákvæmar upplýsingar um vistvænleika og virkni vara, ætti að koma fram með skýrum hætti að vikmörk sannprófana, sem sett eru fram í framkvæmdarráðstöfunum, eru aðeins til notkunar af hálfu yfirvalda aðildarríkis í þeim tilgangi að sannreyna að farið sé að tilskildum ákvæðum.

4) Því ætti að breyta reglugerðum framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1275/2008 ([2]), (EB) nr. 107/2009 ([3]), (EB) nr. 278/2009 ([4]), (EB) nr. 640/2009 ([5]), (EB) nr. 641/2009 ([6]), (EB) nr. 642/2009 ([7]), (EB) nr. 643/2009 ([8]), (ESB) nr. 1015/2010 ([9]), (ESB) nr. 1016/2010 ([10]), (ESB) nr. 327/2011 ([11]), (ESB) nr. 206/2012 ([12]), (ESB) nr. 547/2012 ([13]), (ESB) nr. 932/2012 ([14]), (ESB) nr. 617/2013 ([15]), (ESB) nr. 666/2013 ([16]), (ESB) nr. 813/2013 ([17]), (ESB) nr. 814/2013 ([18]), (ESB) nr. 66/2014 ([19]), (ESB) nr. 548/2014 ([20]), (ESB) nr. 1253/2014 ([21]), (ESB) 2015/1095 ([22]), (ESB) 2015/1185 ([23]), (ESB) 2015/1188 ([24]), (ESB) 2015/1189 ([25]) og (ESB) 2016/2281 ([26]) til samræmis við það.

5) Gögn frá aðilum í lýsingariðnaðinum sýna að margar gerðir ljósapera, sem ætlaðar eru sem valkostur við þær gerðir sem eru hvað minnst skilvirkar og hafa verið bannaðar (eins og halógenperur fyrir rafveituspennu sem ætlað er að koma í stað glóðarpera), myndu hverfa alfarið af markaðinum með reglugerðum (EB) nr. 244/2009 ([27]), (EB) nr. 245/2009 ([28]) og (ESB) nr. 1194/2012 ([29]) ef framleiðendum væri bannað að beita aðferðinni við að gefa upp gögn og upplýsingar, sem lýst er í mælistöðlum, til stuðnings vikmörkum sannprófana í þessum reglugerðum á þann hátt sem samrýmist gildandi venjum í iðnaðinum. Því er ekki viðeigandi að breyta þessum þremur reglugerðum með þessari reglugerð, heldur að skýra nánar fyrirhugaða notkun vikmarka í tengslum við endurmat á tengdum lágmarkskröfum þegar þessar reglugerðir verða næst endurskoðaðar.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 346, 20.12.2016, bls. 51. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 198/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót með 1. mgr. 19. gr. tilskipunar 2009/125/EB.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 1275/2008

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1275/2008 er breytt í samræmi við I. viðauka við þessa reglugerð.

2. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 107/2009

Ákvæðum I. og II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 107/2009 er breytt í samræmi við II. viðauka við þessa reglugerð.

3. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 278/2009

Ákvæðum I. og II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 278/2009 er breytt í samræmi við III. viðauka við þessa reglugerð.

4. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 640/2009

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 640/2009 er breytt í samræmi við IV. viðauka við þessa reglugerð.

5. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 641/2009

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 641/2009 er breytt í samræmi við V. viðauka við þessa reglugerð.

6. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 642/2009

Ákvæðum II. og III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 642/2009 er breytt í samræmi við VI. viðauka við þessa reglugerð.

7. gr.

Breytingar á reglugerð (EB) nr. 643/2009

Ákvæðum V. viðauka við reglugerð (EB) nr. 643/2009 er breytt í samræmi við VII. viðauka við þessa reglugerð.

8. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 1015/2010

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1015/2010 er breytt í samræmi við VIII. viðauka við þessa reglugerð.

9. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 1016/2010

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1016/2010 er breytt í samræmi við IX. viðauka við þessa reglugerð.

10. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 327/2011

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 327/2011 er breytt í samræmi við X. viðauka við þessa reglugerð.

11. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 206/2012

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 206/2012 er breytt í samræmi við XI. viðauka við þessa reglugerð.

12. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 547/2012

Ákvæðum IV. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 547/2012 er breytt í samræmi við XII. viðauka við þessa reglugerð.

13. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 932/2012

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 932/2012 er breytt í samræmi við XIII. viðauka við þessa reglugerð.

14. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 617/2013

Reglugerð (ESB) nr. 617/2013 er breytt sem hér segir:

1) Í stað seinni e-liðar í 20. mgr. 2. gr. komi eftirfarandi:

„e) deiling með 1 000 breytir mega í gíga,“

2) Ákvæðum II. og III. viðauka er breytt í samræmi við XIV. viðauka við þessa reglugerð.

15. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 666/2013

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 666/2013 er breytt í samræmi við XV. viðauka við þessa reglugerð.

16. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 813/2013

Ákvæðum IV. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 813/2013 er breytt í samræmi við XVI. viðauka við þessa reglugerð.

17. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 814/2013

Ákvæðum V. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 814/2013 er breytt í samræmi við XVII. viðauka við þessa reglugerð.

18. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 66/2014

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 66/2014 er breytt í samræmi við XVIII. viðauka við þessa reglugerð.

19. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 548/2014

Ákvæðum III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 548/2014 er breytt í samræmi við XIX. viðauka við þessa reglugerð.

20. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) nr. 1253/2014

Ákvæðum VI. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1253/2014 er breytt í samræmi við XX. viðauka við þessa reglugerð.

21. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) 2015/1095

Ákvæðum IX., X. og XI. viðauka við reglugerð (ESB) 2015/1095 er breytt í samræmi við XXI. viðauka við þessa reglugerð.

22. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) 2015/1185

Ákvæðum IV. viðauka við reglugerð (ESB) 2015/1185 er breytt í samræmi við XXII. viðauka við þessa reglugerð.

23. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) 2015/1188

Ákvæðum IV. viðauka við reglugerð (ESB) 2015/1188 er breytt í samræmi við XXIII. viðauka við þessa reglugerð.

24. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) 2015/1189

Ákvæðum IV. viðauka við reglugerð (ESB) 2015/1189 er breytt í samræmi við XXIV. viðauka við þessa reglugerð.

25. gr.

Breytingar á reglugerð (ESB) 2016/2281

Ákvæðum IV. viðauka við reglugerð (ESB) 2016/2281 er breytt í samræmi við XXV. viðauka við þessa reglugerð.

26. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 30. nóvember 2016.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

(1) Stjtíð. ESB L 285, 31.10.2009, bls. 10.
(2) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1275/2008 frá 17. desember 2008 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun raf- og rafeindatækja til heimilis- og skrifstofunota með tilliti til aflþarfar þeirra í reiðuham eða þegar slökkt er á þeim (Stjtíð. ESB L 339, 18.12.2008, bls. 45).
(3) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 107/2009 frá 4. febrúar 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB um kröfur varðandi visthönnun á einföldum aðgangskössum (set-top boxes) (Stjtíð. ESB L 36, 5.2.2009, bls. 8).
(4) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 278/2009 frá 6. apríl 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun ytri aflgjafa með tilliti til aflþarfar þeirra í lausagangi og meðalnýtni við álag (Stjtíð. ESB L 93, 7.4.2009, bls. 3).
(5) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 640/2009 frá 22. júlí 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun á rafmagnshreyflum (Stjtíð. ESB L 191, 23.7.2009, bls. 26).
(6) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 641/2009 frá 22. júlí 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun á sjálfstæðum hringrásardælum án ásþéttis og hringrásardælum án ásþéttis sem eru felldar inn í vörur (Stjtíð. ESB L 191, 23.7.2009, bls. 35).
(7) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 642/2009 frá 22. júlí 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun á sjónvörpum (Stjtíð. ESB L 191, 23.7.2009, bls. 42).
(8) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 643/2009 frá 22. júlí 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun á kælitækjum til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 191, 23.7.2009, bls. 53).
(9) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1015/2010 frá 10. nóvember 2010 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun þvottavéla til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 293, 11.11.2010, bls. 21).

([10]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1016/2010 frá 10. nóvember 2010 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun uppþvottavéla til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 293, 11.11.2010, bls. 31).

([11]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 327/2011 frá 30. mars 2011 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun viftna sem ganga fyrir hreyflum með rafinnafl á bilinu 125 W og 500 kW (Stjtíð. ESB L 90, 6.4.2011, bls. 8).

([12]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 206/2012 frá 6. mars 2012 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun loftræstisamstæðna og viftna (Stjtíð. ESB L 72, 10.3.2012, bls. 7).

([13]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 547/2012 frá 25. júní 2012 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun vatnsdælna (Stjtíð. ESB L 165, 26.6.2012, bls. 28).

([14]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 932/2012 frá 3. október 2012 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun þurrkara til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 278, 12.10.2012, bls. 41).

([15]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 617/2013 frá 26. júní 2013 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun tölva og netþjóna (Stjtíð. ESB L 175, 27.6.2013, bls. 13).

([16]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 666/2013 frá 8. júlí 2013 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun ryksugna (Stjtíð. ESB L 192, 13.7.2013, bls. 24).

([17]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 813/2013 frá 2. ágúst 2013 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun hitara fyrir rými og sambyggðra hitara (Stjtíð. ESB L 239, 6.9.2013, bls. 136).

([18]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 814/2013 frá 2. ágúst 2013 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun vatnshitara og geymslutanka fyrir heitt vatn (Stjtíð. ESB L 239, 6.9.2013, bls. 162).

([19]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 66/2014 frá 14. janúar 2014 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun bakarofna, helluborða og gufugleypa til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 29, 31.1.2014, bls. 33).

([20]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 548/2014 frá 21. maí 2014 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar litla, meðalstóra og stóra aflspenna (Stjtíð. ESB L 152, 22.5.2014, bls. 1).

([21]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1253/2014 frá 7. júlí 2014 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun loftræstieininga (Stjtíð. ESB L 337, 25.11.2014, bls. 8).

([22]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1095 frá 5. maí 2015 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun kæli- eða frystiskápa, sem notaðir eru í atvinnuskyni, blásturskæliskápa og blástursfrystiskápa, þjöppusamstæðna með eimsvala og vökvakæla fyrir vinnslukerfi (Stjtíð. ESB L 177, 8.7.2005, bls. 19).

([23]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1185 frá 24. apríl 2015 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun staðbundinna rýmishitara sem nota eldsneyti í föstu formi (Stjtíð. ESB L 193, 21.7.2015, bls. 1).

([24]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1188 frá 28. apríl 2015 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun staðbundinna rýmishitara (Stjtíð. ESB L 193, 21.7.2013, bls. 76).

([25]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1189 frá 28. apríl 2015 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun katla fyrir eldsneyti í föstu formi (Stjtíð. ESB L 193, 21.7.2015, bls. 100).

([26]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/2281 frá 30. nóvember 2016 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB um ramma til að setja fram kröfur varðandi visthönnun að því er varðar orkutengdar vörur með tilliti til krafna varðandi visthönnun á vörum til lofthitunar, vörum til kælingar, vökvakælum fyrir vinnslukerfi með hátt úttakshitastig og hitaspírala (Stjtíð. ESB L 346, 20.12.2016, bls. 1).

([27]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 244/2009 frá 18. mars 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun óstefnuvirkra ljósapera til heimilisnota (Stjtíð. ESB L 76, 24.3.2009, bls. 3).

([28]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 245/2009 frá 18. mars 2009 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2005/32/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun flúrpera án innbyggðrar straumfestu, háþrýstra úrhleðslupera og varðandi straumfestur og lampa fyrir slíkar ljósaperur og um niðurfellingu á tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2000/55/EB (Stjtíð. ESB L 76, 24.3.2009, bls. 17).

([29]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1194/2012 frá 12. desember 2012 um framkvæmd tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2009/125/EB að því er varðar kröfur varðandi visthönnun stefnuvirkra ljósapera, ljósdíóðupera og tengds búnaðar (Stjtíð. ESB L 342, 14.12.2012, bls. 1).

———

I. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1275/2008

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

1. SANNPRÓFUNARAÐFERÐ

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

c) ef yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflunni hér á eftir.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflunni hér á eftir.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í 8. lið II. viðauka og í 2. hluta þessa viðauka. Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflunni hér á eftir, og skulu eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Vikmörk við sannprófun

Gerð kröfu	Flokkur	Vikmörk
a- og b-liður 1. liðar eða a- og b-liður 2. liðar II. viðauka	Að því er varðar aflþörf sem er yfir 1,00 W	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
	Að því er varðar aflþörf sem er 1,00 W eða minni	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.
c-liður 3. liðar og a-liður 4. liðar II. viðauka	Á ekki við	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.

2. PRÓFUNARAÐFERÐ FYRIR NETTENGDAN BÚNAÐ

Til að prófa hvort farið sé að kröfunum, sem settar eru fram í c-lið 3. liðar og a-lið 4. liðar II. viðauka, skulu yfirvöld aðildarríkis nota aðferðina, sem sett er fram í 1. hluta þessa viðauka, eftir að hafa slökkt á og/eða aftengt, eftir því sem við á, öll nettengi einingarinnar.

Til að prófa hvort farið sé að öðrum kröfum, sem settar eru fram í 3. og 4. lið II. viðauka, skulu yfirvöld aðildarríkis prófa staka einingu sem hér segir:

Ef búnaðurinn hefur, eins og tilgreint er í tæknigögnunum, eina gerð nettengis og ef tvö eða fleiri tengi af þeirri gerð eru tiltæk er eitt þessara tengja valið af handahófi og það tengi er tengt við viðeigandi net í samræmi við hámarksforskrift tengisins. Ef um er að ræða mörg þráðlaus nettengi af sömu gerð skal gera önnur þráðlaus tengi óvirk ef mögulegt er. Ef um er að ræða mörg fasttengd nettengi af sömu gerð skal, vegna sannprófunar á kröfunum sem settar eru fram í 3. lið í II. viðauka, gera önnur nettengi óvirk ef mögulegt er. Ef aðeins eitt nettengi er tiltækt er það tengi tengt við viðeigandi net í samræmi við hámarksforskrift tengisins.

Kveikt er á einingunni. Þegar einingin, sem kveikt er á, starfar rétt er heimilt að skipta yfir í nettengdan reiðuham og mæla aflþörfina. Síðan er viðeigandi kveikja send í búnaðinn í gegnum nettengið og athugað hvort búnaðurinn hafi verið endurvirkjaður.

Ef búnaðurinn hefur, eftir því sem tilgreint er í tæknigögnunum, fleiri en eina gerð af nettengi, skal endurtaka eftirfarandi aðferð fyrir hverja gerð nettengis. Ef tvær eða fleiri gerðir af nettengjum eru tiltæk er eitt tengi valið af handahófi fyrir hverja gerð nettengis og það tengi er tengt viðeigandi neti í samræmi við hámarksforskrift tengisins.

Ef einungis eitt tengi er tiltækt fyrir tiltekna gerð nettengis skal það tengi tengt við viðeigandi net, sem er í samræmi við hámarksforskrift tengisins. Ef mögulegt er skulu þráðlaus tengi, sem eru ekki í notkun, gerð óvirk. Ef um er að ræða sannprófun á kröfunum, sem settar eru fram í 3. lið í II. viðauka, skulu þráðlaus nettengi, sem eru ekki í notkun, gerð óvirk ef mögulegt er.

Kveikt er á einingunni. Þegar eining, sem kveikt er á, starfar rétt er heimilt að skipta yfir í nettengdan reiðuham og mæla aflþörfina. Síðan er viðeigandi kveikja send í búnaðinn í gegnum nettengið og athugað hvort búnaðurinn hefur verið endurvirkjaður. Ef tvær eða fleiri gerðir (röklegs) nettengis deila einu raunlægu nettengi er þessi aðferð endurtekin fyrir hverja gerð röklegs nettengis á meðan hin röklegu tengin eru röklega aftengd.“

II. VIÐAUKI

Breytingar á I. og II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 107/2009

1) Önnur málsgrein 5. liðar I. viðauka fellur brott.

2) Í stað II. viðauka komi eftirfarandi:

„II. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- og b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld í aðildarríki skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í I. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Ákvæði 1. og 2. liðar I. viðauka, eftir því sem við á	Vikmörk við sannprófun
Að því er varðar aflþörf sem er yfir 1,00 W	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Að því er varðar aflþörf sem er 1,00 W eða minni	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.“

III. VIÐAUKI

Breytingar á I. og II. viðauka við reglugerð (EB) nr. 278/2009

1) Önnur málsgrein 2. liðar I. viðauka fellur brott.

2) Í stað II. viðauka komi eftirfarandi:

„II. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga sem gerðar eru samkvæmt g-lið og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) ef yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflunni hér á eftir.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- og b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflunni hér á eftir.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í I. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflunni hér á eftir, og skulu eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Í lausagangi	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.
Meðaltalið fyrir nýtni við álagsskilyrði 1-4 eins og þau eru skilgreind í I. viðauka.	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

IV. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 640/2009

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum), þ.m.t. heildartapið (1-η) sem er mikilvæg viðmiðun fyrir nýtni, viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 3.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstaðan, sem um getur í c-lið 2. liðar, fæst ekki:

   a) hvað varðar tegundir, sem eru framleiddar í færri en fimm eintökum á ári, skal tegundin ekki teljast samræmast ákvæðum þessarar reglugerðar,

   b) hvað varðar tegundir, sem eru framleiddar í fimm eða fleiri eintökum á ári, skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár, þ.m.t. heildartapið (1-η) sem er mikilvæg viðmiðun fyrir nýtni, uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 3.

5) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í b-lið 4. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

6) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. liðar, a-liðar 4. liðar og 5. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 3, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–6. lið að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 3

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Hreyflar á aflsviðinu 0,75-150 kW	Hreyflar á aflsviðinu 150-375 kW
Heildartap (1-η)	Að hámarki 15% yfir gildunum sem fengin eru með yfirlýstum gildum skv. I. viðauka	Að hámarki 10% yfir gildunum sem fengin eru með yfirlýstum gildum skv. I. viðauka“.

V. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 641/2009

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþáttur	Vikmörk við sannprófun
Orkunýtnistuðull	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 7%.“

VI. VIÐAUKI

Breytingar á II. og III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 642/2009

1) Fjórði undirliður c-liðar 1. hluta II. viðauka fellur brott.

2) Í stað fyrirsagnar III. viðauka komi „Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur“.

3) Í stað A-hluta III. viðauka komi eftirfarandi:

„A. Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld í aðildarríkjunum, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð. Þau skulu einnig beita skrefunum, sem sett eru fram í a- og b-lið 2. liðar og 3. lið hér á eftir, við sannprófunaraðferðina sem sett er fram í B-hluta þessa viðauka.

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld í aðildarríki skulu nota reikningsaðferðirnar, sem settar eru fram í I. viðauka, og mæliskilyrðin sem sett eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Aflþörf, þegar kveikt er á tæki, er gefin upp í 1. og 2. lið 1. hluta I. viðauka.	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 7%.
Reiðuhamur/í ham þar sem slökkt er, eftir því sem við á, eru gefin upp í a- og b-lið 1. liðar og a- og b-lið 2. liðar I. viðauka.	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.
Hlutfall hámarksljóma er gefið upp í 5. hluta I. viðauka.	Ákvarðað gildi skal ekki vera undir 60% af hámarksljóma sjónvarpsins í sínu bjartasta ástandi þegar kveikt er á því.“

4) Í stað 9., 10., 11. og 12. mgr. B-hluta III. viðauka komi eftirfarandi:

„Tegundin telst vera í samræmi við ákvæði þessarar reglugerðar ef niðurstöðurnar fyrir hverja gerð nettengis víkja ekki meira en 7% frá yfirlýstum gildum.

Að öðrum kosti skulu þrjár einingar til viðbótar prófaðar. Tegundin telst vera í samræmi við ákvæði þessarar reglugerðar ef meðaltal ákvörðuðu gildanna víkur ekki meira en 7% frá yfirlýstu gildunum.

Að öðrum kosti telst varan ekki uppfylla kröfurnar.

Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni upp niðurstöður úr prófunum og aðrar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæðin liggur fyrir.“

———

VII. VIÐAUKI

Breytingar á V. viðauka við reglugerð (EB) nr. 643/2009

Í stað V. viðauka komi eftirfarandi:

„V. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir kælitækja til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir kælitækja til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. og IV. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Brúttórúmmál	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3% eða einum lítra, hvort heldur er hærra gildið.
Rúmmál geymslutanks	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3% eða einum lítra, hvort heldur er hærra gildið. Ef notandi getur stillt hlutfallslega rúmmál búrhólfsins og kælihólfsins skal mæla rúmmálið þegar búrhólfið er stillt á minnsta rúmmál.
Frystigeta	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Orkunotkun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið (E_{24h}) en sem nemur 10%.
Aflþörf kælitækja til heimilisnota með 10 lítra rúmmál eða minna.	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.
Raki í vínkælum	Ákvarðað gildi fyrir rakastig skal ekki fara meira en 10% yfir það yfirlýsta bil sem gefið er upp, í hvaða átt sem er.“

VIII. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1015/2010

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir þvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir þvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkjanna skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árleg orkunotkun (AE_C)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið AE_C en sem nemur 10%.
Þvottavirknistuðull (I_W)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið I_W en sem nemur 4%.
Orkunotkun (E_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 10%. Ef velja þarf þrjár viðbótareiningar skal meðaltal ákvörðuðu gildanna fyrir þessar þrjár einingar ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 6%.
Tímalengd kerfis (T_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_t en sem nemur 10%.
Vatnsnotkun (W_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið W_t en sem nemur 10%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði og þegar hann er í reiðuham eftir notkun (P_o og P_l)	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru yfir 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 10%. Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru jöfn eða lægri en 1,00 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Tímalengd reiðuhams eftir notkun (T_l)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_l en sem nemur 10%.“

IX. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1016/2010

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir uppþvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir uppþvottavéla til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkjanna skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árleg orkunotkun (AE_C)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið AE_C en sem nemur 10%.
Hreinsunarafkastastuðull (I_C)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið I_C en sem nemur 10%.
Þurrkunarafkastastuðull (I_D)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið I_D en sem nemur 19%.
Orkunotkun (E_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 10%. Ef velja þarf þrjár viðbótareiningar skal meðaltal ákvörðuðu gildanna fyrir þessar þrjár einingar ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 6%.
Tímalengd kerfis (T_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_t en sem nemur 10%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði og þegar hann er í reiðuham eftir notkun (P_o og P_l)	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru yfir 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 10%. Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru jöfn eða lægri en 1,00 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Tímalengd í reiðuham eftir notkun (T_l)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_l en sem nemur 10%.“

X. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 327/2011

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 3.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstaðan, sem um getur í c-lið 2. liðar, fæst ekki:

   a) hvað varðar tegundir, sem eru framleiddar í færri en fimm eintökum á ári, skal tegundin ekki teljast samræmast ákvæðum þessarar reglugerðar,

   b) hvað varðar tegundir, sem eru framleiddar í fimm eða fleiri eintökum á ári, skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Tegundirnar skulu teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 3.

5) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í b-lið 4. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

6) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. liðar, a-liðar 4. liðar og 5. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 3, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–6. lið að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 3

Vikmörk við sannprófun

Mæliþáttur	Vikmörk við sannprófun
Heildarnýtni (η_e)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en gildið sem stendur fyrir 90% af samsvarandi yfirlýstu gildi.“

XI. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 206/2012

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundið orkunýtnihlutfall (*SEER*)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Árstíðabundinn nýtnistuðull (*SCOP*)	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Aflþörf í reiðuham:	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Orkunýtnihlutfall (EER_{rated})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Nýtnistuðull (COP_{rated})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Hljóðaflsstig	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2 dB(A).“

XII. VIÐAUKI

Breytingar á IV. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 547/2012

Í stað IV. viðauka komi eftirfarandi:

„IV. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í II. viðauka við þessa reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld í aðildarríkjunum, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sem eru tilgreind í töflu 2.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 2.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 2, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 2

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Nýtni við bestu orkunýtni (BEP) (η_{BEP})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Nýtni við hlutahleðslu (PL) (η_{PL})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Nýtni við ofhleðslu (OL) (η_{OL})	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

XIII. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 932/2012

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir þurrkara til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir þurrkara til heimilisnota, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu beita áreiðanlegum, nákvæmum og samanburðarnákvæmum mæliaðferðum, þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra mæliaðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni, þ.m.t. aðferðir sem kveðið er á um í skjölum sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í þeim tilgangi í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*. Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Vegin árleg orkunotkun *(AE_C)*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið AE_C en sem nemur 6%.
Vegin orkunotkun (E_t)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið E_t en sem nemur 6%.
Vegin þéttingarafköst *(C_t)*	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið C_t en sem nemur 6%.
Vegin tímalengd kerfis *(T_t)*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_t en sem nemur 6%.
Aflþörf þegar slökkt er á búnaði og þegar hann er í reiðuham eftir notkun (P_o og P_l)	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru yfir 1,0 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 6%. Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_l, sem eru jöfn eða lægri en 1,00 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_l en sem nemur 0,10 W.
Tímalengd reiðuhams eftir notkun *(T_l)*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið T_l en sem nemur 6%.“

XIV. VIÐAUKI

Breytingar á II. og III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 617/2013

1) Í stað liðar 6.2.1 í II. viðauka komi eftirfarandi:

„6.2.1 Tölvan skal lækka hraða allra virkra íðnetstenginga, sem er 1 gígabiti á sekúndu (Gb/s) eða meiri, þegar hún fer í dvala eða ham þar sem slökkt er en ræsing yfir staðarnet er möguleg.“

2) Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Mælingar markaðseftirlitsyfirvalda og sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

1. MÆLINGAR

Í þeim tilgangi að uppfylla kröfur þessarar reglugerðar og til sannprófunar á því að kröfur þessarar reglugerðar séu uppfylltar skal, við mælingar og útreikninga, nota samhæfða staðla, sem tilvísunarnúmer hafa verið birt fyrir í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*, eða aðrar áreiðanlegar, nákvæmar og samanburðarnákvæmar aðferðir þar sem tillit er tekið til almennt viðurkenndra aðferða sem byggjast á nýjustu og fullkomnustu tækni og gefa niðurstöður með lítilli óvissu.

Tölvur, sem settar eru á markað án stýrikerfis sem getur stutt kerfi sem notar bætt samskipunar- og orkuskil (ACPI) eða sambærilegt kerfi, skulu prófaðar með stýrikerfi sem styður kerfi sem notar bætt samskipunar- og orkuskil (eða sambærilegt kerfi).

2. SANNPRÓFUN MARKAÐSEFTIRLITSYFIRVALDA Á ÞVÍ AÐ VARA UPPFYLLI KRÖFUR

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í II. viðauka við þessa reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld í aðildarríkjunum, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni eða tegundarsamskipaninni.

2) Tegundin eða tegundarsamskipanin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni eða tegundarsamskipaninni, skv. 3.–5. hluta þessa viðauka, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem reiknuð eru út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana, sem eru tilgreind í 3. og 4. hluta þessa viðauka, og einingin uppfylli kröfur um virkjun orkustjórnunar sem tilgreindar eru í 5. hluta þessa viðauka.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki skal tegundin og allar tegundarsamskipanir, sem falla undir sömu vöruupplýsingar (samkvæmt liðum 7.1.2 og 7.3.2 í II. viðauka), ekki teljast uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis prófa þrjár viðbótareiningar af sömu tegund eða eina eða fleiri tegundarsamskipanir sem falla undir sömu vöruupplýsingar (samkvæmt liðum 7.1. 2 og 7.3.2 í II. viðauka).

5) Tegundin eða tegundarsamskipanin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk í 3. og 4. hluta þessa viðauka og allar einingarnar uppfylla kröfur um virkjun orkustjórnunar sem tilgreindar eru í 5. hluta þessa viðauka.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki skal tegundarsamskipanin og allar tegundir, sem falla undir sömu vöruupplýsingar (samkvæmt liðum 7.1.2 og 7.3.2 í II. viðauka), ekki teljast uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í þessum viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í 3. og 4. hluta þessa viðauka, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Ekki skal beita öðrum vikmörkum.

3. E_{TEC}, DVALI, ÞEGAR SLÖKKT ER Á BÚNAÐI OG LÆGSTA AFLÞARFARSTILLING:

1) Þar sem kröfur um aflþörf er meiri en 1,00 W eða þar sem kröfur um orkunotkun, sem eru settar fram sem heildaraflnotkun, leiða til kröfu um aflþörf, sem er meiri en 1,00 W í a.m.k. einum aflham, skal tegundarsamskipanin teljast uppfylla viðeigandi kröfur, sem settar eru fram í liðum 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.2 og 2.3 í II. viðauka, ef prófunarniðurstöður fara ekki yfir viðeigandi vikmörk sannprófana sem tilgreind eru í töflunni hér á eftir.

Vikmörk við sannprófun þar sem kröfur um aflþörf eru meiri en 1,00 W

Kröfur eru settar fram í	Vikmörk við sannprófun
liðum 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 og 2.3 í II. viðauka	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 7%.
lið 2.2 í II. viðauka (með og án viðbótarheimildarinnar sem sett er fram í lið 2.4)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 7%.

Heimilt er að bæta viðbótarheimild, eins og um getur í lið 2.4 í II. viðauka, við kröfuna, sem tilgreind er í lið 2.2, ef tegundarsamskipanin er sett á markað með ræsingarvirkni yfir staðarnet virka í dvala. Prófa skal tegundarsamskipanina bæði með ræsingarvirknina yfir staðarnet virka og óvirka og ætti hún að uppfylla báðar kröfurnar. Tegundarsamskipan, sem sett er á markað án íðnetsvirkni, skal prófuð án þess að ræsing yfir staðarnet sé virk.

2) Þar sem kröfur um aflþörf eru 1,00 W eða minni, skal tegundarsamskipanin teljast uppfylla viðeigandi kröfur, sem settar eru fram í liðum 3.1 og 4.1 í II. viðauka, ef prófunarniðurstöður fara ekki yfir viðeigandi vikmörk sannprófana sem tilgreind eru í töflunni hér á eftir.

Vikmörk við sannprófun þar sem kröfur um aflþörf eru 1,00 W og minni

Kröfur eru settar fram í	Vikmörk við sannprófun
lið 3.1 í II. viðauka (með og án viðbótarheimildarinnar sem sett er fram í lið 3.3)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.
lið 4.1 í II. viðauka (með og án viðbótarheimildarinnar sem sett er fram í lið 4.3)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,10 W.

Heimilt er að bæta viðbótarheimild, eins og kveðið er á um í lið 3.3 í II. viðauka, við kröfuna, sem tilgreind er í lið 3.1, ef tegundarsamskipanin er sett á markað með „upplýsinga- eða stöðuvísi“.

Heimilt er að bæta viðbótarheimild, eins og kveðið er á um í lið 4.3 í II. viðauka við kröfuna sem tilgreind er í lið 4.1, ef tegundarsamskipanin er sett á markað með ræsingarvirkni yfir staðarnet virka þegar slökkt er. Prófa skal tegundarsamskipanina bæði með ræsingarvirknina yfir staðarnet virka og óvirka og ætti hún að uppfylla báðar kröfurnar. Tegundarsamskipan, sem sett er á markað án íðnetsvirkni, skal prófuð án þess að ræsing yfir staðarnet sé virk.

4. ORKUNÝTNI INNRI AFLGJAFA

Tegundin skal teljast uppfylla kröfurnar, sem settar eru fram í 5. lið II. viðauka, ef prófunarniðurstöður fara ekki yfir viðeigandi vikmörk sem tilgreind eru í töflunni hér á eftir.

Vikmörk við sannprófun á orkunýtni innri aflgjafa

Kröfur eru settar fram í	Vikmörk við sannprófun
Meðaltalið fyrir nýtni við álagsskilyrði, eins og þau eru skilgreind í II. viðauka, fer niður fyrir viðeigandi kröfur um meðalnýtni við álag.	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2%.
Meðaltalið fyrir aflstuðulinn, eins og hann er skilgreindur í II. viðauka, fer niður fyrir viðeigandi kröfur fyrir aflstuðulinn.	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.

5. VIRKJUN ORKUSTJÓRNUNAR

Við sannprófun á því hvort farið sé að kröfunum, sem settar eru fram í lið 6.1 í II. viðauka, skulu yfirvöld aðildarríkis nota viðeigandi aðferð til að mæla aflþörf eftir að orkustjórnunarvirkni, eða sambærileg virkni, hefur skipt búnaðinum yfir í viðeigandi aflham.

Við sannprófun á því hvort farið sé að kröfunum, sem settar eru fram í liðum 6.2.1–6.2.6 í II. viðauka, skal tegundarsamskipanin teljast uppfylla viðeigandi kröfur sem settar eru fram í:

— lið 6.2.1 ef hraði allra virkra íðnetstenginga sem er 1 gígabiti á sekúndu (Gb/s) eða meiri er lækkaður þegar borðtölva, sambyggð borðtölva eða fistölva skiptir yfir í dvala eða ham þar sem slökkt er en ræsing yfir staðarnet er möguleg,

— lið 6.2.2 ef borðtölva, sambyggð borðtölva eða fistölva verður að fullu nothæf, þ.m.t. myndsetning allra tengdra skjáa, innan fimm sekúndna eftir að vakningaratburður er settur af stað þegar tölvan er í dvala,

— lið 6.2.3 ef skjár sem tengdur er við borðtölvu, sambyggða borðtölvu eða fistölvu fer í dvala innan 10 mínútna frá því að notandi aðhafðist eitthvað síðast,

— lið 6.2.4 ef hægt er að gera ræsingarvirkni yfir staðarnet í dvala og þegar slökkt er virka og óvirka,

— lið 6.2.5 ef borðtölva, sambyggð borðtölva eða fistölva fer í dvala innan 30 mínútna frá því að notandi aðhafðist eitthvað síðast,

— lið 6.2.6 ef notendur geta með auðveldum hætti gert þráðlausar nettengingar virkar og óvirkar og notendum er gefið skýrt til kynna með tákni, ljósi eða öðru sambærilegu, þegar þráðlausar nettengingar hafa verið gerðar virkar eða óvirkar.“

———

XV. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 666/2013

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir ryksugna, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum ryksugna sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir ryksugna, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árleg orkunotkun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Rykupptaka á teppi	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,03%.
Rykupptaka á hörðu gólfefni	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 0,03%.
Ryklosun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 15%.
Hljóðaflsstig	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið.
Endingartími mótors	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

XVI. VIÐAUKI

Breytingar á IV. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 813/2013

Í stað IV. viðauka komi eftirfarandi:

„IV. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 8.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar aðrar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri sambærilegum tegundum.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 8.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin og allar aðrar sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 8, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 8

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar, η_s	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Orkunýtni vatnshitunar, η_{wh}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Hljóðaflsstig, L_{WA}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2 dB(A).
Losun köfnunarefnisoxíða	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 20%.“

XVII. VIÐAUKI

Breytingar á V. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 814/2013

Í stað V. viðauka komi eftirfarandi:

„V. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 7.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir vatnshitara eða geymslutanka fyrir heitt vatn, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 7.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin og allar tegundir vatnshitara eða geymslutanka fyrir heitt vatn, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. og IV. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 7, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 7

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Dagleg raforkunotkun, Q_{elec}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Hljóðaflsstig, L_{WA}, inni og/eða úti	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2 dB.
Dagleg eldsneytisnotkun, Q_{fuel}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Losun köfnunarefnisoxíða	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 20%.
Vikuleg eldsneytisnotkun með snjallstýringu, $Q_{fuel,week,smart}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg raforkunotkun með snjallstýringu, $Q_{elec,week,smart}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg eldsneytisnotkun án snjallstýringar, $Q_{fuel,week}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Vikuleg raforkunotkun án snjallstýringar, $Q_{elec,week}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Rúmmál, *V*	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2%.
Blandað vatn við 40 °C, *V40*	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3%.
Ljósopsflatarmál sólargleypis, A_{sol}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 2%.
Aflþörf dælu, *solpump*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3%.
Aflþörf í reiðuham, *solstandby*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Fast tap, *S*	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

XVIII. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 66/2014

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 7.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki, telst tegundin og allar tegundir sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 7.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 7, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 7

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Massi bakarofna til heimilisnota, M	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið M en sem nemur 5%.
Rúmmál hólfs í bakarofni til heimilisnota, V	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið V en sem nemur 5%.
$EC_{\text{electric cavity}}$, $EC_{gas\ cavity}$	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin $EC_{electric\ cavity}$ og $EC_{qas\ cavity}$ en sem nemur 5%.
$EC_{electrichob}$	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærri en yfirlýsta gildið $EC_{electric\ hob}$ en sem nemur 5%.
EE_{gashob}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið $EE_{gas\ hob}$ en sem nemur 5%.
W_{BEP}, W_L	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin W_{BEP} og W_L en sem nemur 5%.
Q_{BEP}, P_{BEP}	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera lægri en yfirlýstu gildin Q_{BEP} og P_{BEP} en sem nemur 5%.
Q_{max}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið Q_{max} en sem nemur 8%.
E_{middle}	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið E_{middle} en sem nemur 5%.
Hljóðaflsstig, L_{WA}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið L_{WA}.
P_o, P_s	Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_s skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_s en sem nemur 10%.Ákvörðuð gildi aflþarfar P_o og P_s, sem eru jöfn eða lægri en 1,00 W, skulu ekki vera hærri en yfirlýstu gildin P_o og P_s en sem nemur 0,10 W.“

XIX. VIÐAUKI

Breytingar á III. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 548/2014

Í stað III. viðauka komi eftirfarandi:

„III. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð og viðaukum hennar, skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld í aðildarríkjunum, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni. Með tilliti til þyngdar- og stærðartakmarkana við flutninga á meðalstórum og stórum aflspennum geta aðildarríki tekið ákvörðun um að taka upp sannprófunaraðferðina á athafnasvæði framleiðenda áður en þeir eru teknir í notkun á lokaákvörðunarstað.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka tilskipunar 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a-, b- eða c-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í II. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–4. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Töp við álag	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Tómgangstöp	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Rafaflið sem þarf fyrir kælikerfið fyrir tómgangsnotkun	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

XX. VIÐAUKI

Breytingar á VI. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1253/2014

Í stað VI. viðauka komi eftirfarandi:

„VI. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir loftræstieininga, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstaðan, sem um getur í c-lið 2. liðar, fæst ekki:

   a) hvað varðar tegundir, sem eru framleiddar í færri en fimm eintökum á ári, skal tegundin ekki teljast samræmast ákvæðum þessarar reglugerðar,

   b) hvað varðar tegundir, sem eru framleiddar í fimm eða fleiri eintökum á ári, skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda. Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 1.

5) Ef niðurstaðan, sem um getur í b-lið 4. liðar, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir loftræstieininga, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

6) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. liðar, a-liðar 4. liðar og 5. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VIII. og IX. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 1, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–6. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 1

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Sértækt orkuinnafl (SPI)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en 1,07 sinnum yfirlýst gildi.
Varmanýtni loftræstieininga fyrir íbúðarhúsnæði og loftræstieininga sem ekki eru fyrir íbúðarhúsnæði	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en 0,93 sinnum yfirlýst gildi.
SFP_{int}	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en 1,07 sinnum yfirlýst gildi.
Orkunýtni viftu í einátta loftræstieiningu sem ekki er fyrir íbúðarhúsnæði	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en 0,93 sinnum yfirlýst gildi.
Hljóðaflsstig loftræstieiningar fyrir íbúðarhúsnæði	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið, að viðbættum 2 dB.
Hljóðaflsstig loftræstieiningar sem ekki er fyrir íbúðarhúsnæði	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið, að viðbættum 5 dB.“

XXI. VIÐAUKI

Breytingar á ákvæðum IX., X. og XI. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 2015/1095

1) Í stað IX. viðauka komi eftirfarandi:

„IX. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara, sem er ætluð kæli- eða frystiskápum sem notaðir eru í atvinnuskyni, uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 8.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar tegundir kæli- eða frystiskápa, sem notaðir eru í atvinnuskyni, og hafa verið skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar vörur, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar vörur í tæknigögnum.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 8.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin og allir sambærilegir kæli- eða frystiskápar sem notaðir eru í atvinnuskyni og hafa verið skráðir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar vörur ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. og IV. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 8, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 8

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Nettórúmmál	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 3%.
Orkunotkun (*E24h*)	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.“

2) Í stað X. viðauka komi eftirfarandi:

„X. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara, sem er ætluð fyrir þjöppusamstæður með eimsvala, uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 9.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 9.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VI. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 9, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 9

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundið orkunýtingarhlutfall (*SEPR*) þjöppusamstæðna með eimsvala með málkæliafköst sem eru yfir 2 kW við lágt hitastig og 5 kW við miðlungshitastig.	Ákvarðað gildi skal ekki vera meira en 10% lægra en yfirlýsta gildið, þegar A-liður mælist við málkæliafköst.
Málnýtnistuðull (COP_A) þjöppusamstæðna með eimsvala með málkæliafköst sem eru undir 2 kW við lágt hitastig og 5 kW við miðlungshitastig.	Ákvarðað gildið skal ekki vera meira en 10% lægra en yfirlýsta gildið mælt við málkæliafköst.
Málnýtnistuðlar COP_B, COP_C og COP_D þjöppusamstæðna með eimsvala með málkæliafköst sem eru yfir 2 kW við lágt hitastig og 5 kW við miðlungshitastig.	Ákvörðuð gildi skulu ekki vera meira en 10% lægri en yfirlýsta gildið mælt við málkæliafköst.“

3) Í stað XI. viðauka komi eftirfarandi:

„XI. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara, sem er ætluð vökvakælum fyrir vinnslukerfi, uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 10.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 10.

6) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 5. lið, fást ekki telst tegundin ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í VIII. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 10, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 10

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundið orkunýtingarhlutfall (*SEPR*)	Ákvarðað gildi skal ekki vera meira en 10% lægra en yfirlýsta gildið, þegar A-liður mælist við málkæliafköst.
Málorkunýtnihlutfall (EER_A)	Ákvarðað gildi skal ekki vera meira en 10% lægra en yfirlýsta gildið mælt við málkæliafköst.“

XXII. VIÐAUKI

Breytingar á VI. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 2015/1185

Í stað IV. viðauka komi eftirfarandi:

„IV. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 4. Einingin skal prófuð með einni eða fleiri tegundum eldsneytis, sem hafa svipaða eiginleika og eldsneytið eða eldsneytin sem framleiðandinn notaði til að framkvæma mælingarnar sem lýst er í III. viðauka.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki, telst tegundin og allar tegundir sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 4.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 4, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 4

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar, η_s	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.
Losun efnisagna	Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 20 mg/m^3 við 13% súrefni, að því er varðar staðbundna rýmishitara með opnu eldhólfi, sem nota eldsneyti í föstu formi, staðbundna rýmishitara með lokuðu eldhólfi, sem nota eldsneyti í föstu formi, þó ekki pressaðan við í formi pilla og eldavélar þegar losunin er mæld í samræmi við aðferðina sem lýst er í 1. lið i. liðar í a-lið 4. liðar III. viðauka. Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 10 mg/m^3 við 13% súrefni, að því er varðar staðbundna rýmishitara með lokuðu eldhólfi fyrir eldsneyti í föstu formi, sem nota pressaðan við í formi pilla, þegar losunin er mæld í samræmi við aðferðina sem lýst er í 1. lið i. liðar í a-lið 4. liðar III. viðauka. Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 1 g/kg þegar losunin er mæld í samræmi við aðferðina sem lýst er í 2. lið i. liðar í a-lið 4. liðar III. viðauka. Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 0,8 g/kg þegar losunin er mæld í samræmi við aðferðina sem lýst er í 3. lið i. liðar í a-lið 4. liðar III. viðauka.
Losun loftkenndra, lífrænna efnasambanda	Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 25 mg C/m^3 við 13% súrefni, að því er varðar staðbundna rýmishitara með opnu eldhólfi, sem nota eldsneyti í föstu formi, staðbundna rýmishitara með lokuðu eldhólfi, sem nota eldsneyti í föstu formi, þó ekki pressaðan við í formi pilla, og eldavélar. Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 15 mg C/m^3 við 13% súrefni, að því er varðar staðbundna rýmishitara með lokuðu eldhólfi fyrir eldsneyti í föstu formi, sem nota pressaðan við í formi pilla.
Losun kolsýrings	Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 275 mg/m^3 við 13% súrefni að því er varðar staðbundna rýmishitara með opnu eldhólfi, sem nota eldsneyti í föstu formi, staðbundna rýmishitara með lokuðu eldhólfi, sem nota eldsneyti í föstu formi, þó ekki pressaðan við í formi pilla, og eldavélar. Ákvarðað gildi skal ekki fara yfir yfirlýsta gildið en sem nemur 60 mg/m^3 við 13% súrefni að því er varðar staðbundna rýmishitara með lokuðu eldhólfi fyrir eldsneyti í föstu formi, sem nota pressaðan við í formi pilla.
Losun köfnunarefnisoxíða	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 30 mg/m^3 við 13% súrefni, gefið upp sem köfnunarefnistvíoxíð.“

XXIII. VIÐAUKI

Breytingar á VI. viðauka við reglugerð (ESB) 2015/1188

Í stað IV. viðauka komi eftirfarandi:

„IV. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 9.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki, telst tegundin og allar tegundir sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstaðan, sem um getur í c-lið 2. liðar, fæst ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar, nema ef um er að ræða staðbundna rafmagnsrýmishitara, sem teljast þá ekki uppfylla ákvæðin án frekari prófana, og öðlast þá 6. og 7. liður hér á eftir tafarlaust gildi. Að því er varðar aðrar tegundir mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 9.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 4. eða 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 9, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 9

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar, η_s, fyrir staðbundna rafmagnsrýmishitara	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið við nafnvarmaafköst einingarinnar.
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar, η_s, fyrir staðbundna rýmishitara til heimilisnota sem nota loftkennt eldsneyti og staðbundna rýmishitara til heimilisnota sem nota fljótandi eldsneyti	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar, η_s, fyrir staðbundna lýsandi rýmishitara og staðbundna pípugeislahitara fyrir rými	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Losun köfnunarefnisoxíða frá staðbundnum rýmishiturum til heimilisnota sem nota loftkennt eldsneyti, staðbundnum rýmishiturum til heimilisnota sem nota fljótandi eldsneyti, staðbundnum lýsandi rýmishiturum og staðbundnum pípugeislahiturum fyrir rými	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.“

XXIV. VIÐAUKI

Breytingar á IV. viðauka við reglugerð (ESB) 2015/1189

Í stað IV. viðauka komi eftirfarandi:

„IV. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 2. Einingin skal prófuð með einni eða fleiri tegundum eldsneytis, sem hafa svipaða eiginleika og eldsneytið eða eldsneytin sem framleiðandinn notaði til að framkvæma mælingarnar sem lýst er í III. viðauka.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki, telst tegundin og allar tegundir sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar. Að öðrum kosti mega þessar þrjár viðbótareiningar vera af einni eða fleiri mismunandi tegundum sem hafa verið skráðar sem sambærilegar tegundir í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda.

5) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 2.

6) Ef niðurstaðan, sem um getur í 5. lið, fæst ekki telst tegundin og allar tegundir, sem eru skráðar í tæknigögnum framleiðanda eða innflytjanda sem sambærilegar tegundir, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

7) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum annarra aðildarríkja og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3. og 6. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 2, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–7. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 2

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar, η_s	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 4%.
Losun efnisagna	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 9 mg/m^3.
Losun loftkenndra, lífrænna efnasambanda	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 7 mg/m^3.
Losun kolsýrings	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 30 mg/m^3.
Losun köfnunarefnisoxíða	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 30 mg/m^3.“

XXV. VIÐAUKI

Breytingar á IV. viðauka við reglugerð (ESB) 2016/2281

Í stað IV. viðauka komi eftirfarandi:

„IV. VIÐAUKI

Sannprófun markaðseftirlitsyfirvalda á því að vara uppfylli kröfur

Vikmörk sannprófana, sem skilgreind eru í þessum viðauka, eiga aðeins við um sannprófun yfirvalda aðildarríkis á mældum mæliþáttum og skal framleiðandi eða innflytjandi ekki nota þau sem leyfileg vikmörk til að ákvarða gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnunum, eða við túlkun þessara gilda, með það fyrir augum að ná fram samræmi eða til að sýna fram á betri frammistöðu með einhverjum hætti.

Við sannprófun á því hvort tegund vöru uppfylli kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð skv. 2. mgr. 3. gr. tilskipunar 2009/125/EB, skulu yfirvöld aðildarríkjanna, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka, beita eftirfarandi aðferð:

1) Yfirvöld aðildarríkis skulu sannprófa staka einingu af tegundinni.

2) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur, að því tilskildu að:

   a) gildin, sem gefin eru upp í tæknigögnum skv. 2. lið IV. viðauka við tilskipun 2009/125/EB (yfirlýst gildi), og, eftir atvikum, gildin, sem notuð eru til að reikna út þessi gildi, séu ekki hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en niðurstöður samsvarandi mælinga, sem gerðar eru samkvæmt g-lið, og

   b) yfirlýstu gildin uppfylli allar kröfurnar, sem mælt er fyrir um í þessari reglugerð, og allar tilskildar vöruupplýsingar, sem framleiðandinn eða innflytjandinn birtir, innihaldi ekki gildi, sem eru hagstæðari fyrir framleiðandann eða innflytjandann en yfirlýstu gildin, og

   c) þegar yfirvöld aðildarríkis prófa einingu af tegundinni, uppfylli ákvörðuð gildi (gildi viðeigandi mæliþátta, eins og þau mælast við prófanir, og gildin sem eru reiknuð út frá þessum mælingum) viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 30.

3) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í a- eða b-lið 2. liðar, fást ekki telst tegundin og allar aðrar tegundir, þar sem upplýsinga í tæknigögnum hefur verið aflað á sama grunni, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

4) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki fyrir tegundir vöru til lofthitunar, vöru til kælingar, vökvakæla fyrir hátt hitastig eða hitaspírala með ≥ 70 kW málhitunar-, málkæli- eða málfrystiafköst eða tegundir, sem eru framleiddar í færri en fimm eintökum á ári, telst tegundin og allar aðrar tegundir, þar sem upplýsinga í tæknigögnum hefur verið aflað á sama grunni, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

5) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í c-lið 2. liðar, fást ekki fyrir tegundir vöru til lofthitunar, vöru til kælingar, vökvakæla fyrir hátt hitastig eða hitaspírala með < 70 kW málhitunar-, málkæli- eða málfrystiafköst eða tegundir, sem eru framleiddar í meira en fimm eintökum á ári, skulu yfirvöld aðildarríkis velja þrjár viðbótareiningar af sömu tegund til prófunar.

6) Tegundin skal teljast uppfylla viðeigandi kröfur ef meðaltal þessara ákvörðuðu gilda fyrir einingarnar þrjár uppfyllir viðkomandi vikmörk sannprófana sem eru tilgreind í töflu 30.

7) Ef niðurstöðurnar, sem um getur í 6. lið, fást ekki telst tegundin og allar aðrar tegundir, þar sem upplýsinga í tæknigögnum hefur verið aflað á sama grunni, ekki uppfylla ákvæði þessarar reglugerðar.

8) Yfirvöld aðildarríkis skulu gefa yfirvöldum í öðrum aðildarríkjum og framkvæmdastjórninni allar viðeigandi upplýsingar, án tafar, eftir að ákvörðun um að tegundin uppfylli ekki ákvæði 3., 4. og 7. liðar liggur fyrir.

Yfirvöld aðildarríkis skulu nota mæli- og reikningsaðferðirnar sem settar eru fram í III. viðauka.

Yfirvöld aðildarríkis skulu eingöngu beita vikmörkum sannprófana, sem sett eru fram í töflu 30, og eingöngu beita aðferðinni, sem lýst er í 1.–8. lið, að því er varðar kröfurnar sem um getur í þessum viðauka. Öðrum vikmörkum, á borð við þau sem eru sett fram í samhæfðum stöðlum eða einhverri annarri mæliaðferð, skal ekki beitt.

Tafla 30

Vikmörk við sannprófun

Mæliþættir	Vikmörk við sannprófun
Árstíðabundin orkunýtni rýmishitunar ($\eta_{s,h}$) fyrir vörur til lofthitunar við málhitunarafköst einingarinnar	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Árstíðabundin orkunýtni rýmiskælingar ($\eta_{s,c}$) fyrir vörur til kælingar við málkælingarafköst einingarinnar	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 8%.
Hljóðaflsstig (L_{WA}) fyrir vörur til lofthitunar og vörur til kælingar	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 1,5 dB.
Losun köfnunarefnisoxíða frá vörum til lofthitunar og vörum til kælingar sem nota eldsneyti gefin upp sem köfnunarefnistvíoxíð	Ákvarðað gildi skal ekki vera hærra en yfirlýsta gildið en sem nemur 20%.
Árstíðabundið orkunýtingarhlutfall (*SEPR*) vökvakæla fyrir vinnslukerfi með hátt hitastig við málkæliafköst einingarinnar	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 10%.
Málorkunýtnihlutfall (EER_A) vökvakæla fyrir vinnslukerfi með hátt hitastig við málkæliafköst einingarinnar	Ákvarðað gildi skal ekki vera lægra en yfirlýsta gildið en sem nemur 5%.“

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/363 **2017/EES/74/10**

frá 1. mars 2017

um breytingu á reglugerð (ESB) nr. 965/2012 að því er varðar sérstakt samþykki fyrir starfrækslu eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli að næturlagi eða við blindflugsskilyrði og að því er varðar samþykkiskröfur fyrir þjálfun vegna hættulegs varnings fyrir sérstaka starfrækslu í ábataskyni, starfrækslu flókinna, vélknúinna loftfara, sem er ekki í ábataskyni, og sérstaka starfrækslu flókinna, vélknúinna loftfara sem er ekki í ábataskyni (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 216/2008 frá 20. febrúar 2008 um sameiginlegar reglur um almenningsflug og um stofnun Flugöryggisstofnunar Evrópu og niðurfellingu tilskipunar ráðsins 91/670/EBE, reglugerðar (EB) nr. 1592/2002 og tilskipunar 2004/36/EB ([1]), einkum 5. mgr. 8. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Framkvæmdastjórnin ætti, samkvæmt reglugerð (EB) nr. 216/2008, að samþykkja nauðsynlegar framkvæmdarreglur til að ákveða skilyrðin um örugga starfrækslu loftfara. Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 965/2012 ([2]) eru þessi skilyrði ákvörðuð.

2) Beiting reglugerðar (ESB) nr. 965/2012 á ferjuflug myndi leiða til óhóflegs, rekstrarlegs álags á atvinnugreinina og lögbær yfirvöld. Til að innleiða nálgun, sem er hóflegri og byggð á áhættumati, við beitingu þeirrar reglugerðar ætti að undanskilja einstök ferjuflug, þar sem hvorki er verið að flytja farþega né farm, sem farið er í vegna endurbóta, viðgerða, viðhaldseftirlits, skoðana, afhendingar, útflutnings eða í sambærilegum tilgangi, beitingu reglugerðar (ESB) nr. 965/2012.

3) Í kröfum og ráðlögðum starfsvenjum Alþjóðaflugmálastofnunarinnar, sem settar eru fram í I. hluta 6. viðauka við Chicago-samninginn um alþjóðlegt almenningsflug, sem undirritaður var í Chicago 7. desember 1944, er að finna ákvæði um starfrækslu eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli að næturlagi eða við blindflugsskilyrði. Í þessum ákvæðum er m.a. krafa um að þegar slík starfræksla er samþykkt verði ríki flugrekanda/umráðanda að tryggja að farið sé að tilteknum skilyrðum, þ.m.t. skilyrði sem varða uppsettan búnað, áreiðanleika hreyfils, hreyfilvöktun, verklagsreglur og þjálfun flugliða. Lög Sambandsins ætti að aðlaga að þessum ákvæðum með því að tryggja að flutningaflug eins hreyfils flugvéla að næturlagi eða við blindflugsskilyrði sé háð samþykki lögbærs yfirvalds.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 55, 2.3.2017, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 201/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XIII. viðauka (Flutningastarfsemi) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 79, 19.3.2008, bls. 1.

([2]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 965/2012 frá 5. október 2012 um tæknilegar kröfur og stjórnsýslumeðferðir er varða flugrekstur samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 216/2008 (Stjtíð. ESB L 296, 25.10.2012, bls. 1).

4) Möguleikinn á starfrækslu, samkvæmt undanþágu, eins hreyfils flugvéla samkvæmt þeim skilyrðum sem sett eru fram í núverandi undanþágum sem aðildarríkin veita í samræmi við 2. mgr. 8. gr. reglugerðar ráðsins (EBE) nr. 3922/91 ([1]), sem kveðið er á um í 5. mgr. 6. gr. reglugerðar (ESB) nr. 965/2012, úreldist með þessari aðlögun. Því ætti að fella það ákvæði brott. Til að tryggja snurðulaus umskipti skulu þessar undanþágur vegna starfrækslu eins hreyfils flugvéla, þ.m.t. skilyrðin sem sett eru fram þar, teljast jafngilda samþykki lögbærs yfirvalds, eins og krafist er samkvæmt aðlöguðum lagaramma, í hæfilegan tíma eftir gildistökudag þessarar reglugerðar. Að þessu umbreytingartímabili loknu ætti ekki lengur að vera hægt að treysta á slíkar undanþágur og þess í stað er krafist framangreindra samþykkja. Halda skal áfram að tilkynna allar viðeigandi breytingar á starfrækslu þessara flugvéla á umbreytingartímabilinu.

5) Flugrekendur, sem stunda sérstaka starfrækslu í ábataskyni, sem og flugrekendur sem stunda starfrækslu flókinna, vélknúinna loftfara, sem er ekki í ábataskyni eða sérstaka starfrækslu flókinna, vélknúinna loftfara, sem er ekki í ábataskyni, sem flytja ekki hættulegan varning, ættu að halda áfram að setja saman og viðhalda þjálfunaráætlunum í tengslum við hættulegan varning í samræmi við III. viðauka (ORO-hluta) reglugerðar (ESB) nr. 965/2012. Til þess að unnt sé að innleiða nálgun, sem er hóflegri og byggð á áhættumati, við beitingu þessara reglna ætti þó ekki lengur að krefjast þess að lögbært yfirvald samþykki slíkar þjálfunaráætlanir.

6) Því ætti að breyta reglugerð (ESB) nr. 965/2012 til samræmis við það. Einkum ætti að breyta III. viðauka (ORO-hluta) við þá reglugerð til að aðlaga nálgun, sem er hóflegri og byggð á áhættumati, að samþykkiskröfunum vegna þjálfunaráætlana í tengslum við hættulegan varning og bæta ætti nýjum kafla við í V. viðauka hennar (SPA-hluta) um starfrækslu eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli.

7) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, varðandi eins hreyfils flugvélar með hverfihreyfli byggjast á áliti ([2]) Flugöryggisstofnunar Evrópu í samræmi við b-lið 2. mgr. 17. gr. og 1. mgr. 19. gr. reglugerðar (EB) nr. 216/2008.

8) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 65. gr. reglugerðar (EB) nr. 216/2008.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Reglugerð (ESB) nr. 965/2012 er breytt sem hér segir:

1) Í stað 3. mgr. 6. gr. komi eftirfarandi:

„3. Þrátt fyrir 5. gr. og án þess að hafa áhrif á reglugerð (EB) nr. 216/2008 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 748/2012 (*) varðandi flugleyfi, skal flug, sem tengist því að taka í notkun nýjar tegundir loftfara eða gera breytingar á tegundum loftfara, sem hönnunar- eða framleiðslufyrirtæki framkvæma innan réttinda sinna, sem og ferjuflug, þar sem hvorki er verið að flytja farþega né farm, sem farið er í vegna endurbóta, viðgerða, viðhaldseftirlits, skoðana, afhendingar, útflutnings eða í sambærilegum tilgangi, framkvæmt samkvæmt þeim skilyrðum sem sett eru fram í landslögum aðildarríkjanna.

(*) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 748/2012 frá 3. ágúst 2012 um framkvæmdarreglur varðandi lofthæfi- og umhverfisvottun loftfara og tilheyrandi framleiðsluvara, hluta og búnaðar og varðandi vottun hönnunar- og framleiðslufyrirtækja (Stjtíð. ESB L 224, 21.8.2012, bls. 1).“

2) Í stað 5. mgr. 6. gr. komi eftirfarandi:

„5. Fram til 2. september 2017 skulu undanþágur, sem veittar eru fyrir 22. mars 2017 í samræmi við 2. mgr. 8. gr. reglugerðar (EBE) nr. 3922/91, eins og kveðið er á um í 5. mgr. 6. gr. reglugerðar (ESB) nr. 965/2012, sem var í gildi fram til 22. mars 2017, teljast jafngilda samþykkjunum sem um getur í a-lið CAT.POL.A.300 í IV. viðauka (CAT-hluta). Eftir 2. september 2017 skulu þessar undanþágur ekki lengur gilda um starfrækslu eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli.

([1]) Reglugerð ráðsins (EBE) nr. 3922/91 frá 16. desember 1991 um samræmingu á tæknikröfum og stjórnsýslumeðferð á sviði flugmála (Stjtíð. EB L 373, 31.12.1991, bls. 4).

([2]) Álit Flugöryggisstofnunar Evrópu nr. 06/2015 frá 11. nóvember 2015 varðandi reglugerð framkvæmdastjórnarinnar um tæknilegar kröfur vegna sérstaks samþykkis fyrir starfrækslu eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli að næturlagi eða við blindflugsskilyrði.

Ef til stendur að gera breytingu á starfrækslu þessara flugvéla á bilinu 22. mars 2017 til 2. september 2017, sem hefur áhrif á skilyrðin sem sett eru fram í þessum undanþágum, skal fyrirhuguð breyting tilkynnt framkvæmdastjórninni og Flugöryggisstofnuninni áður en henni er hrint í framkvæmd. Framkvæmdastjórnin og Flugöryggisstofnunin skulu leggja mat á fyrirhuguðu breytinguna í samræmi við 5. mgr. 14. gr. reglugerðar (EB) nr. 216/2008.“

3) Ákvæðum II., III., IV. og V. viðauka er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

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

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

Gjört í Brussel 1. mars 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

VIÐAUKI

Ákvæðum II., III., IV. og V. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 965/2012 er breytt sem hér segir:

1) Í stað II. viðbætis í II. viðauka (ARO-hluta) komi eftirfarandi:

„II. viðbætir

REKSTRARFORSKRIFTIR **(með fyrirvara um samþykkt skilyrði í rekstrarhandbókinni)**				
Samskiptaupplýsingar útgáfuyfirvalds Símanúmer ([1]): _____ ; Bréfasíma-númer _____ ; Tölvupóstfang: _____				
Flugrekandaskírteini ([2]): Nafn flugrekanda ([3]): Dagsetning ([4]): Undirskrift: Starfar undir viðskiptaheitinu: Rekstrarforskriftir nr.:				
Tegund loftfars ([5]): Skrásetningarmerki ([6]):				
Tegund starfrækslu: Flutningaflug ☐ Farþegar ☐ Farmur ☐ Annað ([7]): _____				
Flugsvæði ([8]):				
Sérstakar takmarkanir ([9]):				
Sérstök samþykki:	Já	Nei	Forskriftir ([10])	Athugasemdir
Hættulegur varningur	☐	☐		
Starfræksla í lélegu skyggni Flugtak Aðflug og lending	☐	☐	FLOKKUR (CAT) ([11]): … RVR ([12]): m DA/H: fet RVR:m	
Minnkaður lágmarkshæðaraðskilnaður (RVSM) ([13]) ☐ Á ekki við	☐	☐		
Fjarflug (ETOPS) ([14]) ☐ Á ekki við	☐	☐	Hámarksfjarflugstími ([15]): mín.	
Leiðsöguforskriftir fyrir starfrækslu þar sem notast er við margþætta, hæfisbundna leiðsögu ([16])	☐	☐		([17])
Lágmarkskröfur um nákvæmni í flugleiðsögu	☐	☐		
Starfræksla eins hreyfils flugvéla með hverfihreyfli að næturlagi eða við blindflugsskilyrði (SET-IMC)	☐	☐	([18])	
Þyrluflug með aðstoð nætursjónkerfis	☐	☐		
Hífingar með þyrlu	☐	☐		
Sjúkraflug með þyrlu	☐	☐		
Starfræksla þyrlu á hafi úti	☐	☐		
Þjálfun öryggis- og þjónustuliða ([19])	☐	☐		
Útgáfa staðfestingarvottorðs fyrir öryggis- og þjónustuliða ([20])	☐	☐		
Áframhaldandi lofthæfi	☐	☐	([21])	
Annað ([22])				

([1]) Síma- og bréfasímanúmer lögbæra yfirvaldsins, þ.m.t. landskóði. Tölvupóstfang skal gefið upp, ef slíkt er tiltækt.
([2]) Hér skal sett inn númer tilheyrandi flugrekandaskírteinis.
([3]) Hér skal sett inn skráð heiti flugrekanda og viðskiptaheiti flugrekanda, ef annað. Hér skal setja inn "starfar undir" fyrir framan viðskiptaheitið.
([4]) Útgáfudagur rekstrarforskrifta (dd-mm-áááá) og undirskrift fulltrúa lögbærs yfirvalds.
([5]) Hér skal setja inn kóða Alþjóðaflugmálastofnunarinnar um framleiðanda loftfars, tegund og röð eða aðalröð, ef tiltekin röð hefur verið tilgreind (t.d. Boeing-737-3K2 eða Boeing-777-232).
([6]) Skrásetningarmerkin eru annaðhvort skráð í rekstrarforskriftum eða í rekstrarhandbókinni. Í seinna tilvikinu verða tilheyrandi rekstrarforskriftir að vísa til hlutaðeigandi síðu í rekstrarhandbókinni. Ef sérstök samþykki eiga ekki öll við um tegund loftfarsins má færa skrásetningarmerki loftfarsins í dálkinn „athugasemdir" fyrir sérstaka samþykkið.
([7]) Hér á að tilgreina aðrar tegundir flutnings (t.d. sjúkraflug).
([8]) Hér skal gefa upp landfræðileg svæði þar sem starfræksla er heimiluð (með vísun í landfræðileg hnit eða tilteknar leiðir, flugupplýsingasvæði eða landamæri þjóðríkja eða landsvæða).
([9]) Hér skal gefa upp gildandi, sérstakar takmarkanir (t.d. einungis sjónflug (VFR), einungis að degi til o.s.frv.).
([10]) Í þennan dálk skal skrá rýmstu viðmiðanirnar fyrir hvert samþykki eða tegund samþykkis (með viðeigandi viðmiðun).
([11]) Hér skal setja inn viðeigandi flokk nákvæmnisaðflugs: LTS CAT I, CAT II, OTS CAT II, CAT IIIA, CAT IIIB eða CAT IIIC. Hér skal setja inn lágmarksflugbrautarskyggni (RVR) í metrum og ákvörðunarhæð (DH) í fetum. Ein lína er notuð fyrir hvern skráðan flokk aðflugs.
([12]) Hér skal setja inn samþykkt lágmarksflugbrautarskyggni við flugtak í metrum. Nota má eina línu fyrir hvert samþykki ef mismunandi samþykki hafa verið veitt.
([13]) Aðeins má haka við í kassann „á ekki við" ef hámarksflughæð loftfars er undir fluglagi 290.
([14]) Fjarflug (ETOPS) á sem stendur aðeins við um tveggja hreyfla loftför. Því má haka við í kassann „á ekki við" ef loftfarstegundin hefur fleiri eða færri en tvo hreyfla.
([15]) Hér má einnig skrá vegalengd þröskulds (í sjómílum), sem og gerð hreyfils.
([16]) Hæfisbundin leiðsaga (PBN): ein lína notuð fyrir hvert sérstakt samþykki fyrir margþættri, hæfisbundinni leiðsögu (t.d. RNP AR APCH) og viðeigandi takmarkanir skráðar í dálkana „Forskriftir" og/eða „Athugasemdir". Samþykki, sem tengjast sérstökum verklagsreglum, fyrir sérstakri starfrækslu samkvæmt RNP AR APCH má skrá í rekstrarforskriftirnar eða rekstrarhandbókina. Í seinna tilvikinu verða tilheyrandi rekstrarforskriftir að vísa til hlutaðeigandi síðu í rekstrarhandbókinni.
([17]) Tilgreina skal hvort sérstaka samþykkið sé takmarkað við tilteknar flugbrautir og/eða flugvelli.
([18]) Hér skal setja inn viðeigandi flugskrokks- og hreyfilssamsetningu.
([19]) Samþykki fyrir því að halda þjálfunarnámskeið og próf, sem umsækjendur þurfa að ljúka til að hægt sé að gefa út staðfestingarvottorð fyrir öryggis- og þjónustuliða, eins og tilgreint er í CC-hluta í V. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1178/2011.
([20]) Samþykki fyrir því að gefa út staðfestingarvottorð fyrir öryggis- og þjónustuliða, eins og tilgreint er í CC-hluta í V. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 1178/2011.
([21]) Nafn einstaklings/stofnunar sem ber ábyrgð á því að tryggja áframhaldandi lofthæfi loftfars og vísun í reglugerðina, sem inniheldur þessa kröfu, þ.e. G-kafli í I. viðauka (M-hluta) við reglugerð (ESB) nr. 1321/2014.
([22]) Hér má setja önnur samþykki eða gögn með því að nota eina línu (eða reit með mörgum línum) fyrir hvert samþykki (t.d. skammbrautarlendingu, starfrækslu í bröttu aðflugi, þyrluflug að/frá almannaheillastað, þyrluflug yfir ótryggu umhverfi sem staðsett er utan þéttbýlis, þyrluflug án getu til að nauðlenda með öruggum hætti, starfrækslu með auknum beygjuhalla, mestu leyfilegu fjarlægð tveggja hreyfla flugvéla frá viðunandi flugvelli án fjarflugsleyfis, loftfar sem notað er fyrir starfrækslu sem er ekki í ábataskyni).

EASA-eyðublað nr. 139, 3. útgáfa."

2) Ákvæðum III. viðauka (ORO-hluta) er breytt sem hér segir:

a) Í stað j- og k-liðar ORO.GEN.110 komi eftirfarandi:

„j) Flugrekandi skal setja saman og viðhalda þjálfunaráætlunum í tengslum við hættulegan varning fyrir starfsfólk sitt, eins og krafist er í tæknilegu fyrirmælunum. Slíkar þjálfunaráætlanir skulu vera í réttu hlutfalli við ábyrgð starfsfólks. Lögbært yfirvald skal fara yfir og samþykkja þjálfunaráætlanir flugrekenda sem stunda flutningaflug, óháð því hvort þeir flytji hættulegan varning eða ekki, og flugrekenda sem stunda starfrækslu aðra en flutningaflug sem um getur í b-, c- og d-lið ORO.GEN.005, og flytja hættulegan varning.

k) Þrátt fyrir j-lið skulu flugrekendur, sem stunda starfrækslu í ábataskyni með einhverju af neðangreindum loftförum, tryggja að flugliðar hafi fengið viðeigandi þjálfun eða upplýsingar svo þeir þekki hættulega varninginn, sem ekki er gefinn upp, sem kemur um borð með farþegum eða sem farmur:

1) svifflugu,

2) loftbelg,

3) eins hreyfils flugvél, sem er knúin skrúfuhreyflum, með 5 700 kg skráðan hámarksflugtaksmassa eða minna og hámarksfjölda farþega í sætafyrirkomulagi við starfrækslu fyrir fimm eða færri, í flugi þar sem flugtak og lending fer fram á sama flugvelli eða starfrækslusvæði samkvæmt sjónflugsreglum að degi til eða

4) þyrlu, sem ekki flokkast sem flókin, vélknúin þyrla, með einn hreyfil og hámarksfjölda farþega í sætafyrirkomulagi við starfrækslu fyrir fimm eða færri, í flugi þar sem flugtak og lending fer fram á sama flugvelli eða starfrækslusvæði samkvæmt sjónflugsreglum að degi til."

b) Í stað a-liðar í ORO.FC.A.250 komi eftirfarandi:

„a) Handhafi atvinnuflugmannsskírteinis (fyrir flugvélar) skal aðeins starfa sem flugstjóri í flutningaflugi á flugvél sem flogið er af einum flugmanni, ef eitt af eftirfarandi skilyrðum er uppfyllt:

1) hann hefur að baki minnst 500 fartíma samanlagt á flugvélum eða er handhafi gildrar blindflugsáritunar þegar um er að ræða farþegaflug samkvæmt sjónflugsreglum utan 50 sjómílna (90 km) radíusar frá brottfararflugvelli,

2) hann hefur að baki minnst 700 fartíma samanlagt á flugvélum, þ.m.t. 400 fartíma sem flugstjóri, þegar um er að ræða starfrækslu á fjölhreyflaflugvél samkvæmt blindflugsreglum. Þessir fartímar skulu fela í sér 100 tíma samkvæmt blindflugsreglum og 40 fartíma við stjórn fjölhreyflaflugvéla; í stað 400 fartíma sem flugstjóri geta komið fartímar sem aðstoðarflugmaður þar sem reglan er að tveir fartímar sem aðstoðarflugmaður jafngildi einum fartíma sem flugstjóri, að því tilskildu að þessum tímum hafi verið safnað í fjölstjórnarumhverfi eins og mælt er fyrir um í rekstrarhandbókinni,

3) hann hefur að baki minnst 700 fartíma samanlagt á flugvélum, þ.m.t. 400 fartíma sem flugstjóri, þegar um er að ræða starfrækslu á eins hreyfils flugvél samkvæmt blindflugsreglum. Þessir fartímar skulu fela í sér 100 fartíma samkvæmt blindflugsreglum; í stað 400 fartíma sem flugstjóri geta komið fartímar sem aðstoðarflugmaður þar sem reglan er að tveir fartímar sem aðstoðarflugmaður jafngildi einum fartíma sem flugstjóri, að því tilskildu að þessum tímum hafi verið safnað í fjölstjórnarumhverfi, eins og mælt er fyrir um í rekstrarhandbókinni.“

3) Ákvæðum IV. viðauka (CAT-hluta) er breytt sem hér segir:

a) Í stað liðar CAT.OP.MPA.136 komi eftirfarandi:

„CAT.OP.MPA.136 Flugleiðir og flugsvæði — eins hreyfils flugvélar

Nema lögbært yfirvald hafi samþykkt annað í samræmi við L-kafla V. viðauka (SPA-hluta) — STARFRÆKSLA EINS HREYFILS FLUGVÉLA MEÐ HVERFIHREYFLI AÐ NÆTURLAGI EÐA VIÐ BLINDFLUGSSKILYRÐI (SET-IMC), skal flugrekandi sjá til þess að eins hreyfils flugvélar séu aðeins starfræktar á flugleiðum, eða innan svæða, þar sem yfirborðið er þannig að mögulegt sé að framkvæma örugga nauðlendingu.“

b) Í stað a-liðar í CAT.OP.MPA.180 komi eftirfarandi:

„a) Ef ekki er mögulegt að nota brottfararflugvöll sem varaflugvöll fyrir flugtak af ástæðum sem tengjast veðri eða afköstum skal flugrekandi velja annan viðunandi varaflugvöll fyrir flugtak sem er ekki í meiri fjarlægð frá brottfararflugvelli en sem nemur:

1) að því er varðar tveggja hreyfla flugvélar:

i. einnar klukkustundar flugi á farflugshraða með einn hreyfil óstarfhæfan, í samræmi við flughandbók, í logni og við staðalskilyrði miðað við raunmassa við flugtak eða

ii. fjarflugstímanum, sem samþykktur er í samræmi við F-kafla í V. viðauka (SPA-hluta), með fyrirvara um allar takmarkanir á lista yfir lágmarksbúnað, að hámarki tveggja klukkustunda flugi á farflugshraða með einn hreyfil óstarfhæfan, í samræmi við flughandbók, í logni og við staðalskilyrði miðað við raunmassa við flugtak,

2) að því er varðar þriggja og fjögurra hreyfla flugvélar, tveggja klukkustunda flugi á farflugshraða með einn hreyfil óstarfhæfan, í samræmi við flughandbók, í logni og við staðalaðstæður miðað við raunmassa við flugtak,

3) að því er varðar starfrækslu sem samþykkt er í samræmi við L-kafla í V. viðauka (SPA-hluta) — STARFRÆKSLA EINS HREYFILS FLUGVÉLA MEÐ HVERFIHREYFLI AÐ NÆTURLAGI EÐA VIÐ BLINDFLUGSSKILYRÐI (SET-IMC), 30 mínútna flugi við venjulegan farflugshraða í logni, á grundvelli raunmassa við flugtak.

Ef farflugshraði fjölhreyfla flugvéla með einn hreyfil óstarfhæfan er ekki gefinn upp í flughandbók skal hraðinn, sem notaður er við útreikningana, vera sá hraði sem næst með því að nota samfellt hámarksafl á þeim hreyfli eða hreyflum sem enn eru virkir.“

c) Í stað a-liðar í CAT.POL.A.300 komi eftirfarandi:

„a) Nema lögbært yfirvald hafi samþykkt annað í samræmi við L-kafla V. viðauka (SPA-hluta) — STARFRÆKSLA EINS HREYFILS FLUGVÉLA MEÐ HVERFIHREYFLI AÐ NÆTURLAGI EÐA VIÐ BLINDFLUGSSKILYRÐI (SET-IMC), skal flugrekandi ekki starfrækja eins hreyfils flugvél:

1) að næturlagi eða

2) við blindflugsskilyrði, nema samkvæmt reglum um sérlegt sjónflug.“

d) Í stað liðar CAT.POL.A.320 komi eftirfarandi:

„CAT.POL.A.320 Á flugleið — eins hreyfils flugvélar

a) Miðað við þau veðurskilyrði sem búist er við fyrir flugið og ef hreyfill bilar skal flugvél geta náð til staðar þar sem unnt er að framkvæma örugga nauðlendingu, að því tilskildu að flugrekandinn hafi samþykki lögbærs yfirvalds í samræmi við L-kafla V. viðauka (SPA-hluta) — STARFRÆKSLA EINS HREYFILS FLUGVÉLA MEÐ HVERFIHREYFLI AÐ NÆTURLAGI EÐA VIÐ BLINDFLUGSSKILYRÐI (SET-IMC), og nýti sér áhættutímabil.

b) Hvað a-lið varðar skal gert skal ráð fyrir að þegar hreyfilbilun á sér stað:

1) fljúgi flugvélin ekki í meiri hæð en svo að stighraði hennar nái 300 fetum á mínútu með hreyfil virkan innan tilgreindra marka fyrir samfellt hámarksafl og

2) sé halli á flugleið minnsti lækkunarhalli, aukinn með 0,5% halla.“

4) Eftirfarandi L-kafli bætist við í V.viðauka (SPA-hluta):

„L-KAFLI

STARFRÆKSLA EINS HREYFILS FLUGVÉLA MEÐ HVERFIHREYFLI AÐ NÆTURLAGI EÐA VIÐ BLINDFLUGSSKILYRÐI (SET-IMC)

SPA.SET-IMC.100 Starfræksla samkvæmt SET-IMC

Í flutningaflugi skal aðeins fljúga eins hreyfils flugvélum að næturlagi eða við blindflugsskilyrði ef flugrekandinn hefur hlotið SET-IMC-samþykki lögbærs yfirvalds.

SPA.SET-IMC.105 SET-IMC-starfrækslusamþykki

Til að hljóta SET-IMC-samþykki lögbærs yfirvalds skal flugrekandi sýna fram á að öll eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

a) að viðeigandi áreiðanleikastig hafi náðst fyrir hverfihreyfilinn við notkun í flota um allan heim fyrir tiltekna flugskrokks- og hreyfilssamsetningu,

b) að sértæk viðhaldsfyrirmæli og -ferli hafi verið innleidd og séu tilgreind í viðhaldsáætlun flugrekanda fyrir loftför, til að tryggja áætlað stig áframhaldandi lofthæfis og áreiðanleika flugvélarinnar og knúningskerfis hennar, í samræmi við I. viðauka (M-hluta) við reglugerð (ESB) nr. 1321/2014, þ.m.t. eftirfarandi þættir:

1) vöktunaráætlun um þróun hreyfils, að undanskildum flugvélum með lofthæfivottorð, sem gefið var út í fyrsta sinn eftir 31. desember 2004, sem skulu hafa sjálfvirkt kerfi til að vakta þróunina,

2) áreiðanleikaáætlun fyrir knúningskerfi og tilheyrandi kerfi,

c) að samsetning flugáhafnar hafi verið ákveðin og innleidd hafi verið áætlun um þjálfun og próf fyrir þá flugliða sem koma að þessari starfrækslu,

d) að settar hafi verið verklagsreglur um starfræksluna þar sem öll eftirfarandi atriði eru tilgreind:

1) hvaða búnaður skuli vera um borð, þ.m.t. starfrækslumörk og viðeigandi færslur í lista yfir lágmarksbúnað,

2) gerð flugáætlana,

3) verklag við eðlilegar aðstæður,

4) viðlagaverklagsreglur, þ.m.t. verklagsreglur við bilun í knúningskerfi, sem og verklagsreglur um nauðlendingu við öll veðurskilyrði,

5) vöktun og skýrslugjöf um flugatvik.

e) að öryggisáhættumat hafi verið framkvæmt, þ.m.t. ákvörðun ásættanlegs áhættutímabils, ef flugrekandi hyggst nýta það.

SPA.SET-IMC.110 Kröfur um búnað fyrir starfrækslu samkvæmt SET-IMC

Í flugvélum, sem eru notaðar við starfrækslu samkvæmt SET-IMC, skal vera eftirfarandi búnaður:

a) tveir aðskildir rafalar, sem hafa hver um sig nægilegt afl fyrir alla nauðsynlega flugmæla, leiðsögukerfi og flugvélarkerfi, sem krafist er fyrir áframhaldandi flug að ákvörðunarflugvelli eða varaflugvelli ákvörðunarstaðar,

b) tveir sjónbaugar sem eru knúnir innbyrðis óháðum orkugjöfum,

c) að því er varðar starfrækslu með farþega, sætisbelti með axlartygjum eða öryggisbelti með skáliggjandi axlaról fyrir hvert farþegasæti,

d) veðurratsjá í loftfari,

e) nægilegt viðbótarsúrefni í flugvélum með jafnþrýstibúnaði fyrir alla farþega, þannig að í kjölfar hreyfilbilunar sé hægt að lækka flug frá vottaðri hámarksfarflugshæð miðað við besta svifhraða og bestu afstöðu fyrir renniflug, þar til loftþrýstingur í farþegarými er sem nemur 13 000 fetum eða lægri, miðað við hámarksþrýstingslækkun í farþegarými,

f) svæðisleiðsögukerfi sem hægt er að forrita með staðsetningum lendingarsvæða og veitir flugliðum leiðsögn í láréttum fleti til að komast að þessum svæðum,

g) ratsjárhæðarmælir,

h) lendingarljós sem getur lýst upp snertipunkt svifhalla úr 200 feta fjarlægð,

i) neyðarraforkubúnaður sem er með fullnægjandi afkastagetu og þol sem, í kjölfar bilunar í rafölum, getur séð öllu neðangreindu fyrir nauðsynlegu afli:

1) mikilvægum flugmælum og svæðisleiðsögutækjum við lækkun flugs frá hámarksflughæð við hreyfilbilun,

2) búnaði fyrir eina endurræsingu hreyfils,

3) ef við á, kerfi til að setja lendingarhjól og -flapa í lendingarstöðu,

4) ratsjárhæðarmæli sem skal vera hægt að nota meðan aðflug til lendingar fer fram,

5) lendingarljósi,

6) einum hitara fyrir stemmurör (e. *pitot heater*),

7) rafkerfi til að tryggja flugmanni nægilega gott útsýni við lendingu, ef slíkt er uppsett,

j) kveikjukerfi sem virkjast sjálfkrafa, eða sem hægt er að stýra handvirkt, við flugtak, lendingu og meðan á flugi stendur ef um er að ræða sýnilegan raka,

k) búnaður fyrir stöðuga vöktun á smurkerfi aflrásarinnar til að greina hvort til staðar séu aðskotahlutir, sem tengja má við yfirvofandi bilun í íhlut drifrásar, þ.m.t. viðvörunarskilti í stjórnklefa,

l) neyðarbúnaður fyrir hreyfilaflstjórnun sem gerir kleift að halda hreyfli gangandi með nægilegu afli til að ljúka flugi örugglega ef um er að ræða hvers konar bilun, sem eðlilegt er að gera ráð fyrir, í eldsneytisstýringunni.“

FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/386 **2017/EES/74/11**

frá 6. mars 2017

um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 1207/2011 um kröfur um afköst og rekstrarsamhæfi kögunar í samevrópska loftrýminu (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 552/2004 frá 10. mars 2004 um rekstrarsamhæfi evrópska netsins fyrir rekstrarstjórnun flugumferðar (rekstrarsamhæfisreglugerðin) ([1]), einkum 5. mgr. 3. gr.,

að höfðu samráði við nefndina um samevrópskt loftrými

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1207/2011 ([2]) er mælt fyrir um kröfur varðandi kerfi, sem stuðla að veitingu kögunargagna, kerfishluta þeirra og tilheyrandi verklags til að tryggja samræmi í afköstum, rekstrarsamhæfi og skilvirkni þessara kerfa innan evrópska netsins fyrir rekstrarstjórnun flugumferðar og varðandi samræmingu milli borgaralegra yfirvalda og hermálayfirvalda.

2) Til að mögulegt sé að útbúa loftför með nýrri eða endurbættri getu þurfa flugrekendur/umráðendur að hafa aðgang að nauðsynlegum forskriftum fyrir búnað eigi síðar en tilgreindar dagsetningar í 4. og 5. mgr. 5. gr. framkvæmdarreglugerðar (ESB) nr. 1207/2011. Hins vegar samrýmast viðeigandi vottunarforskriftir Flugöryggisstofnunar Evrópu („Flugöryggisstofnunin“) að einhverju leyti ekki kröfum framkvæmdarreglugerðar (ESB) nr. 1207/2011 og því ætti að aðlaga þær þannig að þær samrýmist þessum kröfum. Þar af leiðandi hafa ekki allir flugrekendur/umráðendur getað útbúið ný loftför sín með nýrri virkni, sem felur í sér að senda ADS-B-kögunargögn frá loftfari (ADS-B Out) og bættan S-starfsháttt (e. *Mode S Enhanced*) fyrir 8. júní 2016.

3) Enn fremur hafa hagsmunaaðilar tilkynnt að sem stendur samrýmast kerfishlutar kögunarkerfanna, sem eru um borð í loftförum, ekki alltaf framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 1207/2011. Þetta á einkum við um áður notaða ratsjársvara með einfaldan S-starfsháttt (e. *Mode S Elementary*) sem virðast ekki uppfylla nýjasta staðalinn (ED-73E) sem kveðið er á um í viðeigandi vottunarforskriftum Flugöryggisstofnunarinnar. Uppfæra þarf ratsjársvara, sem nota einfaldan S-starfsháttt og uppfylla ekki staðalinn, þannig að þeir samrýmist honum. Að teknu tilliti til kröfunnar um að loftfarið skuli einnig búið ADS-B virkni og bættum S-starfshætti þyrfti, af ástæðum er varða kostnaðarhagkvæmni, að uppfæra kerfishlutana um borð í loftfarinu einu sinni til að útbúa þá með þessum þremur tegundum virkni.

4) Því ætti að breyta þeim dagsetningum sem flugrekendur/umráðendur eiga að hafa uppfyllt viðeigandi kröfur framkvæmdarreglugerðar (ESB) nr. 1207/2011 um rekstrarsamhæfi, til að gefa þeim nægan viðbótartíma. Að teknu tilliti til frekari tafa á vottun og útvegun nauðsynlegs búnaðar, sem hefur áhrif á snurðulausa ísetningu endurbótarhluta í flotann sem fyrir er, er ekki lengur viðeigandi að gera greinarmun á loftförum á grundvelli þeirra dagsetninga sem þau fengu útgefið sérstakt lofthæfivottorð.

5) Til að uppfylla skyldur sínar í tengslum við verndun tíðnirófsins, sem sett er fram í 6. gr. framkvæmdarreglugerðar (ESB) nr. 1207/2011, þurfa aðildarríkin að tryggja að veitendur flugleiðsöguþjónustu hafi nauðsynleg mælitæki og aðferðir til að uppfylla tilskildar kröfur í því skyni að koma í veg fyrir skaðlegar truflanir frá kögunarkerfum á jörðu niðri. Að teknu tilliti til þess að þessar aðferðir til að uppfylla kröfur og þessi tæki séu ekki auðveldlega aðgengileg og að þeim dagsetningum sem flugrekendur/umráðendur eiga að hafa uppfyllt viðeigandi kröfur um rekstrarsamhæfi, hefur verið breytt ætti einnig að breyta dagsetningunum, sem aðildarríkin eiga að hafa uppfyllt viðeigandi kröfur framkvæmdarreglugerðar (ESB) nr. 1207/2011 um verndun tíðnirófs, til að gefa aðildarríkjunum nægan viðbótartíma til að uppfylla skyldur sínar.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 59, 7.3.2017, bls. 34. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 202/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XIII. viðauka (Flutningastarfsemi) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 96, 31.3.2004, bls. 26.

([2]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1207/2011 frá 22. nóvember 2011 um kröfur um afköst og rekstrarsamhæfi kögunar í samevrópska loftrýminu (Stjtíð. ESB L 305, 23.11.2011, bls. 35).

6) Til að tryggja samkvæmni ættu flugrekendur/umráðendur ríkisloftfara að hafa hag af svipaðri frestun framkvæmdardagsetninga og flugrekendur/umráðendur annarra loftfara. Því ætti einnig að breyta dagsetningunum þar sem aðildarríkin eiga að hafa tryggt að ríkisloftför uppfylli viðeigandi kröfur framkvæmdarreglugerðar (ESB) nr. 1207/2011. Einnig ætti að breyta dagsetningum undanþága fyrir tilteknar gerðir loftfara, sem mælt er fyrir um í þeirri framkvæmdarreglugerð, í því skyni að varðveita raunveruleg áhrif þessara reglna og uppfæra ætti tilvísanirnar í þá reglugerð í II. viðauka.

7) Því ætti að breyta framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 1207/2011 til samræmis við það.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 1207/2011 er breytt sem hér segir:

1) Ákvæðum 5. gr. er breytt sem hér segir:

a) Ákvæði 4. mgr. falli brott.

b) Í stað 5., 6. og 7. mgr. komi eftirfarandi:

„5. Flugrekendur/umráðendur skulu tryggja að eigi síðar en 7. júní 2020:

a) séu loftför, sem starfrækt eru fyrir flugin, sem um getur í 2. mgr. 2. gr., búin ratsjársvörum fyrir kögunarsvarratsjá sem hafa þá getu sem sett er fram í A-hluta II. viðauka,

b) séu loftför, með skráðan hámarksflugtaksmassa sem er yfir 5 700 kg eða með hámarksraunhraða í farflugi sem getur farið yfir 250 hnúta, sem starfrækt eru fyrir flugin, sem um getur í 2. mgr. 2. gr., búin ratsjársvörum fyrir kögunarsvarratsjá, sem, til viðbótar við getuna, sem sett er fram í A-hluta II. viðauka, búa yfir getunni sem sett er fram í B-hluta þess viðauka,

c) séu loftför, með skráðan hámarksflugtaksmassa sem er yfir 5 700 kg eða með hámarksraunhraða í farflugi sem getur farið yfir 250 hnúta, sem starfrækt eru fyrir flugin, sem um getur í 2. mgr. 2. gr., búin ratsjársvörum fyrir kögunarsvarratsjá, sem, til viðbótar við getuna, sem sett er fram í A-hluta II. viðauka, búa yfir getunni sem sett er fram í C-hluta þess viðauka,

6. Flugrekendur/umráðendur skulu sjá til þess að loftför, sem eru búin í samræmi við 5. mgr. og með skráðan hámarksflugtaksmassa sem er yfir 5 700 kg eða með hámarksraunhraða í farflugi sem getur farið yfir 250 hnúta, séu starfrækt með fjölþættum loftnetum (e. *antenna diversity*), eins og lýst er í lið 3.1.2.10.4 í IV. bindi 10. viðauka Chicago-samningsins, fjórðu útgáfu, ásamt öllum breytingum til og með nr. 85.

7. Aðildarríki geta sett kröfur um búnað, í samræmi við b-lið 5. mgr., fyrir öll loftför sem starfrækt eru fyrir flugin, sem um getur í 2. mgr. 2. gr., á svæðum þar sem veitendur flugleiðsöguþjónustu veita kögunarþjónustu með notkun kögunargagnanna sem tilgreind eru í B-hluta II. viðauka.“

2) Í 1. og 3. mgr. 6. gr. komi „2. janúar 2020“ í stað „5. febrúar 2015“.

3) Í stað 1., 2., og 3. mgr. 8. gr. komi eftirfarandi:

„1. Aðildarríki skulu tryggja að eigi síðar en 7. júní 2020 séu ríkisloftför, sem starfrækt eru í samræmi við 2. mgr. 2. gr., búin ratsjársvörum fyrir kögunarsvarratsjá með getunni sem sett er fram í A-hluta II. viðauka.

2. Aðildarríki skulu tryggja að eigi síðar en 7. júní 2020 séu ríkisloftför til flutninga með skráðan hámarksflugtaksmassa, sem er yfir 5 700 kg, eða með hámarksraunhraða í farflugi, sem getur farið yfir 250 hnúta, sem starfrækt eru í samræmi við 2. mgr. 2. gr., búin ratsjársvörum fyrir kögunarsvarratsjá, sem, til viðbótar við getuna sem sett er fram í A-hluta II. viðauka, búa yfir getunni sem sett er fram í B- og C-hluta þess viðauka.

3. Eigi síðar en 1. janúar 2019 skulu aðildarríkin senda framkvæmdastjórninni skrá yfir þau ríkisloftför sem ekki er unnt að útbúa með ratsjársvara fyrir kögunarsvarratsjá sem uppfyllir kröfur A-hluta II. viðauka, ásamt rökstuðningi fyrir því að búnaðinn vantar.

Eigi síðar en 1. janúar 2019 skulu aðildarríki senda framkvæmdastjórninni skrá yfir ríkisloftför til flutninga, með skráðan hámarksflugtaksmassa sem er yfir 5 700 kg eða með hámarksraunhraða í farflugi sem getur farið yfir 250 hnúta, sem ekki er unnt að útbúa með ratsjársvara fyrir kögunarsvarratsjá, sem uppfyllir kröfur B- og C-hluta II. viðauka, ásamt rökstuðningi fyrir því að búnaðinn vantar.

Rökstuðningur fyrir því að búnað vantar skal vera eitt af eftirfarandi atriðum:

a) knýjandi tæknilegar ástæður,

b) að hætt verði að starfrækja ríkisloftför, sem starfrækt eru í samræmi við 2. mgr. 2. gr., eigi síðar en 1. janúar 2024,

c) að settar verði takmarkanir á innkaup.“

4) Ákvæðum 14. gr. er breytt sem hér segir:

a) Í stað „8. júní 2016“ í 1. mgr. komi „7. júní 2020“.

b) Í stað „1. júlí 2017“ í 3. mgr. komi „1. janúar 2019“.

5) Ákvæðum II. viðauka er breytt sem hér segir:

a) Í stað fyrirsagnar A-hluta komi eftirfarandi:

„A-hluti: Geta ratsjársvara fyrir kögunarsvarratsjá sem um getur í 4. gr. (3. mgr.), 5. gr. (a-liður 5. mgr.), 7. gr. (2. mgr.) og 8. gr. (1. og 3. mgr.)“.

b) Í stað fyrirsagnar B-hluta komi eftirfarandi:

„B-hluti: Geta ratsjársvara fyrir kögunarsvarratsjá sem um getur í 4. gr. (3. mgr.), 5. gr. (b-liður 5. og 7. mgr.), 7. gr. (2. mgr.) og 8. gr. (2. og 3. mgr.)“.

c) Í stað fyrirsagnar C-hluta komi eftirfarandi:

„C-hluti: Geta ratsjársvara fyrir kögunarsvarratsjá, með tilliti til viðbótarkögunargagna, sem um getur í 4. gr. (3. mgr.), 5. gr. (c-liður 5. mgr.), 7. gr. (2. mgr.), 8. gr. (2. og 3. mgr.) og 14. gr. (1. mgr.)“.

2. gr.

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

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

Gjört í Brussel 6. mars 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

FRAMSELD REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/748 2017/EES/74/12

frá 14. desember 2016

um breytingu á I. viðauka við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 510/2011 til að taka tillit til þróunar á massa nýrra léttra atvinnuökutækja sem skráð voru 2013, 2014 og 2015 (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 510/2011 frá 11. maí 2011 um að setja staðla um mengunarvarnargetu nýrra léttra atvinnuökutækja sem hluta af samþættri stefnu Sambandsins um að draga úr losun koltvísýrings frá léttum ökutækjum ([1]), einkum 5. mgr. 13. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Á þriggja ára fresti ber að lagfæra meðalmassagildið, sem notað er til að reikna út sértæka losun koltvísýrings fyrir hvert nýtt, létt atvinnuökutæki, til að taka tillit til allra breytinga á meðalmassa nýrra ökutækja sem skráð eru í Sambandinu.

2) Ljóst er af vöktun á massa nýrra, léttra atvinnuökutækja, sem voru tilbúin til aksturs og skráð á almanaksárunum 2013, 2014 og 2015, að meðalmassi hefur aukist og því ætti að lagfæra tölugildið M_0 sem um getur í b-lið 1. liðar í I. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 510/2011.

3) Einungis ætti að ákvarða nýja gildið með tilliti til þeirra gilda sem hlutaðeigandi framleiðendur ökutækja hafa getað staðfest og jafnframt ætti við útreikninginn að undanskilja gildin, sem voru augljóslega röng, þ.e. gildi sem eru lægri en 500 kg ásamt gildum sem tengjast ökutækjum sem féllu utan gildissviðs reglugerðar (ESB) nr. 510/2011, þ.m.t. ökutæki með viðmiðunarmassa yfir 2 840 kg. Nýja gildið ætti enn fremur að byggjast á vegnu meðaltali, að teknu tilliti til fjölda nýrra skráninga á hverju viðmiðunarári.

4) Með hliðsjón af því ætti að hækka M_0-gildið, sem á að nota frá og með 2018, um 60,4 kg, úr 1 706,0 í 1 766,4.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Í stað b-liðar 1. liðar í I. viðauka við reglugerð (ESB) nr. 510/2011 komi eftirfarandi:

„Frá 2018:

Sértæk losun á koltvísýringi = $175 + a \times (M - M_0)$

Þar sem:

M = massi ökutækis í kílógrömmum (kg)

M_0 = 1 766,4

a = 0,093.“

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 113, 29.4.2017, bls. 9. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 204/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XX. viðauka (Umhverfismál) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 145, 31.5.2011, bls. 1.

2. gr.

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

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

Gjört í Brussel 14. desember 2016.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

_____

REGLUGERÐ RÁÐSINS (ESB) 2017/997 **2017/EES/74/13**

frá 8. júní 2017

um breytingu á III. viðauka við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/98/EB að því er varðar hættuflokkinn HP 14 „visteitraður“ (*)

RÁÐ EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/98/EB frá 19. nóvember 2008 um úrgang og um niðurfellingu tiltekinna tilskipana ([1]), einkum 2. mgr. 38. gr.,

með hliðsjón af tillögu framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB eru tilgreindir þeir eiginleikar úrgangs sem gera hann hættulegan.

2) Í tilskipun 2008/98/EB er tekið fram að flokkun úrgangs sem hættulegur ætti m.a. að byggjast á löggjöf Sambandsins um íðefni, sérstaklega að því er varðar það að flokka blöndur sem hættulegar, þ.m.t. gildi fyrir styrkleikamörk sem eru notuð í þeim tilgangi. Í ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2000/532/EB ([2]) er tekin saman skrá yfir tegundir úrgangs í því skyni að stuðla að samræmdri flokkun úrgangs og tryggja samræmda ákvörðun á hættulegum eiginleikum úrgangs innan Sambandsins.

3) Í III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB er kveðið á um að röðun í flokka samkvæmt hættulega eiginleikanum HP 14 „visteitraður“ skuli gerð á grundvelli viðmiðana sem mælt er fyrir um í VI. viðauka við tilskipun ráðsins 67/548/EBE ([3]).

4) Tilskipun 67/548/EBE var felld úr gildi frá og með 1. júní 2015 og í stað hennar kom reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 ([4]). Þrátt fyrir það getur tilskipunin gilt um einhverjar blöndur til 1. júní 2017 ef flokkun þeirra, merking og pökkun fór fram í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 1999/45/EB ([5]) og setning á markað fór fram fyrir 1. júní 2015.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 150, 14.6.2017, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 206/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XX. viðauka (Umhverfismál) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 312, 22.11.2008, bls. 3.

([2]) Ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2000/532/EB frá 3. maí 2000 sem kemur í stað ákvörðunar 94/3/EB um skrá yfir úrgang samkvæmt a-lið 1. gr. tilskipunar ráðsins 75/442/EBE um úrgang og ákvörðunar ráðsins 94/904/EB um skrá yfir hættulegan úrgang samkvæmt 4. mgr. 1. gr. tilskipunar ráðsins 91/689/EBE um hættulegan úrgang (Stjtíð. EB L 226, 6.9.2000, bls. 3).

([3]) Tilskipun ráðsins 67/548/EBE frá 27. júní 1967 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna (Stjtíð. EB 196, 16.8.1967, bls. 1).

([4]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

([5]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 1999/45/EB frá 31. maí 1999 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum aðildarríkjanna um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efnablandna (Stjtíð. EB L 200, 30.7.1999, bls. 1).

5) Ákvæðum III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB var skipt út með reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1357/2014 ([1]) í því skyni að laga, eftir því sem við á, skilgreiningarnar á hættulegum eiginleikum að reglugerð (EB) nr. 1272/2008 og skipta út tilvísunum í tilskipun 67/548/EBE fyrir tilvísanir í reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

6) Skilgreiningu á hættulega eiginleikanum HP 14 „visteitraður“ var ekki breytt með reglugerð (ESB) nr. 1357/2014 þar sem frekari rannsókn var nauðsynleg til að tryggja að upplýsingar væru heildstæðar og dæmigerðar að því er varðar hugsanleg áhrif aðlögunar mats á hættulega eiginleikanum HP 14 „visteitraður“ að viðmiðununum sem mælt er fyrir um í reglugerð (EB) nr. 1272/2008. Þar sem þeirri rannsókn er lokið þykir rétt að ráðleggingar í tengslum við hana endurspeglist í mati á hættulega eiginleikanum HP 14 „visteitraður“ að því er varðar úrgang skv. III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB og að laga það mat, að því marki sem unnt er, að viðmiðununum sem mælt er fyrir um í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 varðandi mat á visteiturhrifum íðefna. Þegar hættuflokkun úrgangs er ákvörðuð að því er varðar hættulega eiginleikann HP 14 „visteitraður“ með því að beita reikniformúlu ætti að nota almenn þröskuldsgildi eins og þau eru skilgreind í reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

7) Í VI. viðauka við reglugerð (EB) nr. 1272/2008 eru samræmdir margföldunarstuðlar fyrir takmarkaðan fjölda efna sem eru flokkuð sem „hættuleg fyrir vatnsumhverfi, bráð eiturhrif í 1. undirflokki“ eða „hættuleg fyrir vatnsumhverfi, langvinn eiturhrif í 1. undirflokki“ sem eru notaðir til að ákvarða flokkun á blöndum sem innihalda slík efni. Í ljósi framfara við ákvörðun slíkra margföldunarstuðla getur framkvæmdastjórnin, í samræmi við 2. mgr. 38. gr. tilskipunar 2008/98/EB, endurskoðað reikniaðferðina við mat á efnum með tilliti til hættulega eiginleikans HP 14 „visteitraður“ með það í huga að nota hugsanlega margföldunarstuðla í þeirri aðferð.

8) Þegar prófun fer fram til að meta úrgang með tilliti til hættulega eiginleikans HP 14 „visteitraður“ er rétt að nota viðeigandi aðferðir sem fastsettar eru í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 ([2]) eða aðrar alþjóðlega viðurkenndar prófunaraðferðir og leiðbeiningar. Í ákvörðun 2000/532/EB er kveðið á um að ef hættulegur eiginleiki úrgangs hefur verið metinn með prófun og með því að nota styrk hættulegra efna, eins og fram kemur í III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB, skulu niðurstöður prófunarinnar vega þyngra. Enn fremur ætti að hafa hliðsjón af 12. gr. reglugerðar (EB) nr. 1272/2008, einkum b-lið 12. gr., og aðferðafræði við beitingu hennar. Rétt þykir að framkvæmdastjórnin hvetji til skipta á bestu starfsvenjum að því er varðar prófunaraðferðir við mat á efnum með tilliti til hættulega eiginleikans HP 14 „visteitraður“ með hugsanlega samræmingu þeirra í huga.

9) Rétt þykir að gefa fyrirtækjum og lögbærum yfirvöldum nægan tíma til að aðlagast nýju kröfunum.

10) Nefndin, sem um getur í 39. gr. tilskipunar 2008/98/EB, skilaði ekki áliti um þær ráðstafanir sem kveðið er á um í þessari reglugerð. Því ætti ráðið að samþykkja ráðstafanirnar í samræmi við 4. mgr. 5. gr. a í ákvörðun ráðsins 1999/468/EB ([3]).

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Ákvæðum III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

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

Hún gildir frá og með 5. júlí 2018.

([1]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) nr. 1357/2014 frá 18. desember 2014 um að skipta út III. viðauka við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/98/EB um úrgang og um niðurfellingu tiltekinna tilskipana (Stjtíð ESB L 365, 19.12.2014, bls. 89).

([2]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 frá 30. maí 2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) (Stjtíð. ESB L 142, 31.5.2008, bls.1).

([3]) Ákvörðun ráðsins frá 28. júní 1999 um reglur um meðferð framkvæmdavalds sem framkvæmdastjórninni er falið (Stjtíð. EB L 184, 17.7.1999, bls. 23).

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

Gjört í Lúxemborg 8. júní 2017.

Fyrir hönd ráðsins,

K. SIMSON

forseti.

VIÐAUKI

Ákvæðum III. viðauka við tilskipun 2008/98/EB er breytt sem hér segir:

1) Í stað færslu fyrir HP 14 „visteitraður“ komi eftirfarandi:

„HP 14 „visteitraður“: úrgangur sem hefur eða kann að hafa áhættu í för með sér fyrir eitt eða fleiri umhverfissvið, tafarlaust eða síðar.

Úrgangur sem uppfyllir einhver eftirfarandi skilyrða skal flokkaður sem hættulegur með HP 14:

— Úrgangur sem inniheldur efni sem er flokkað sem ósoneyðandi og fær hættusetningu H420 í samræmi við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 (*) og styrkur slíks efnis er jafn eða yfir styrkleikamörkunum 0,1%.

[c(H420) ≥ 0,1%]

— Úrgangur sem inniheldur eitt eða fleiri efni sem eru flokkuð sem efni sem eru hættuleg fyrir vatnsumhverfi með bráð eiturhrif og fá hættusetningu H400 í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1272/2008 og summa styrks þeirra efna er jöfn eða yfir styrkleikamörkunum 25%. Þröskuldsgildi sem nemur 0,1% skal gilda um slík efni.

[Σ c (H400) ≥ 25%]

— Úrgangur sem inniheldur eitt eða fleiri efni sem eru flokkuð sem efni sem eru hættuleg fyrir vatnsumhverfi með langvinn eiturhrif í 1., 2. eða 3. undirflokki og fá hættusetningu eða hættusetningar H410, H411 eða H412 í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1272/2008 og summa styrks allra efna sem eru flokkuð sem hættuleg fyrir vatnsumhverfi með langvinn eiturhrif í 1. undirflokki (H410) margfaldað með 100 og bætt við summu styrks allra efna sem eru flokkuð sem hættuleg fyrir vatnsumhverfi með langvinn eiturhrif í 2. undirflokki (H411) margfaldað með 10 og bætt við summu styrks allra efna sem eru flokkuð sem hættuleg fyrir vatnsumhverfi með langvinn eiturhrif í 3. undirflokki (H412) er jöfn eða yfir styrkleikamörkunum 25%. Þröskuldsgildi sem nemur 0,1% gildir um efni sem eru flokkuð sem H410 og þröskuldsgildið 1% gildir um efni sem eru flokkuð sem H411 eða H412.

[100 × Σc (H410) + 10 × Σc (H411) + Σc (H412) ≥ 25%]

— Úrgangur sem inniheldur eitt eða fleiri efni sem eru flokkuð sem efni sem eru hættuleg fyrir vatnsumhverfi með langvinn eiturhrif í 1., 2. 3. eða 4. undirflokki og fá hættusetningu eða hættusetningar H410, H411, H412 eða H413 í samræmi við reglugerð (EB) nr. 1272/2008 og summa styrks allra efna sem eru flokkuð sem hættuleg fyrir vatnsumhverfi með langvinn eiturhrif er jöfn eða yfir styrkleikamörkunum 25%. Þröskuldsgildi sem nemur 0,1% gildir um efni sem eru flokkuð sem H410 og þröskuldsgildið 1% gildir um efni sem eru flokkuð sem H411, H412 eða H413.

[Σ c H410 + Σ c H411 + Σ c H412 + Σ c H413 ≥ 25%]

Þar sem: Σ = summa og c = styrkur efnanna.

(*) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).“

2) Athugasemdin fyrir neðan færsluna fyrir HP 15 fellur brott.

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2015/996 2017/EES/74/14

frá 19. maí 2015

um að koma á sameiginlegum matsaðferðum fyrir hávaða samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/49/EB (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2002/49/EB frá 25. júní 2002 um mat og stjórn á hávaða í umhverfinu ([1]), einkum 2. mgr. 6. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Samkvæmt 1. gr. tilskipunar 2002/49/EB er markmiðið með tilskipuninni að skilgreina sameiginlega stefnu þar sem beitt er ákveðinni forgangsröð til að komast hjá, fyrirbyggja eða draga úr skaðlegum áhrifum, þ.m.t. ónæði, af völdum umhverfishávaða. Í því skyni ættu aðildarríkin að ákvarða, með hávaðakortlagningu, álag af völdum umhverfishávaða með sameiginlegum matsaðferðum aðildarríkjanna, tryggja að upplýsingar um umhverfishávaða og áhrif hans séu gerðar aðgengilegar almenningi og samþykkja aðgerðaáætlanir byggðar á niðurstöðum hávaðakortlagningar, í þeim tilgangi að fyrirbyggja og draga úr umhverfishávaða þar sem þörf er á, og sérstaklega þar sem hávaði getur haft skaðleg áhrif á heilsu manna, og að sjá til þess að gæði umhverfis séu varðveitt, með tilliti til hávaða, þar sem þau eru mikil.

2) Samkvæmt 5. gr. tilskipunar 2002/49/EB ættu aðildarríkin að nota hávaðavísana L_{den} og L_{night}, sem um getur í I. viðauka við þá tilskipun, við gerð og endurskoðun stefnumarkandi hávaðakorta í samræmi við 7. gr.

3) Samkvæmt 6. gr. tilskipunar 2002/49/EB ætti að ákvarða gildi hávaðavísanna L_{den} og L_{night} með matsaðferðum sem skilgreindar eru í II. viðauka við þá tilskipun.

4) Samkvæmt 6. gr. tilskipunar 2002/49/EB ætti framkvæmdastjórnin að koma á sameiginlegum matsaðferðum til að ákvarða hávaðavísana L_{den} og L_{night} með endurskoðun á II. viðauka.

5) Samkvæmt 7. gr. tilskipunar 2002/49/EB ættu aðildarríkin að tryggja að eigi síðar en 30. júní 2007 og 30. júní 2012 hafi verið gerð stefnumarkandi hávaðakort sem eru yfirfarin og endurskoðuð, ef þörf krefur, a.m.k. á fimm ára fresti.

6) Í tilskipun 2002/49/EB er kveðið á um aðgerðaáætlanir sem eiga að byggjast á stefnumarkandi hávaðakortum. Gera ætti stefnumarkandi hávaðakort með sameiginlegu matsaðferðunum þegar aðildarríkin hafa samþykkt þessar aðferðir. Aðildarríki mega þó nota aðrar aðferðir til að hanna ráðstafanir sem eiga að taka á forgangsatriðum sem eru tilgreind með því að nota sameiginlegu aðferðirnar sem og til að meta aðrar landsráðstafanir til að fyrirbyggja og draga úr umhverfishávaða.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 168, 1.7.2015, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 207/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XX. viðauka (Umhverfismál) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. EB L 189, 18.7.2002, bls. 12.

7) Á árinu 2008 hleypti framkvæmdastjórnin af stokkunum þróun á samræmdri aðferðafræði varðandi mat á hávaða með verkefninu „Sameiginlegar matsaðferðir fyrir hávaða í ESB“ (CNOSSOS-EU) undir stjórn Sameiginlegrar rannsóknarmiðstöðvar framkvæmdastjórnarinnar. Verkefnið var unnið í nánu samráði við nefndina, sem komið var á fót skv. 18. gr. tilskipunar Evrópuþingsins og ráðsins 2000/14/EB ([1]), og aðra sérfræðinga frá aðildarríkjunum. Niðurstöðurnar voru birtar í tilvísunarskýrslu Sameiginlegu rannsóknarmiðstöðvarinnar um Sameiginlegar matsaðferðir fyrir hávaða í ESB (CNOSSOS-EU) ([2]).

8) Sameiginlegu matsaðferðirnar eru settar fram í viðaukanum við þessa tilskipun framkvæmdastjórnarinnar. Aðildarríkjunum er skylt að nota þessar aðferðir frá og með 31. desember 2018.

9) Samkvæmt 1. mgr. 2. gr. þessarar tilskipunar á að samþykkja matsaðferðirnar, sem kveðið er á um í viðaukanum við þessa tilskipun, eigi síðar en 31. desember 2018 og fram til þess dags er aðildarríkjunum heimilt skv. 2. mgr. 6. gr. tilskipunar 2002/49/EB að halda áfram að nota gildandi matsaðferðir sem þau hafa áður samþykkt á landsvísu.

10) Í samræmi við 12. gr. tilskipunar 2002/49/EB ætti framkvæmdastjórnin að laga II. viðauka að framförum í tækni og vísindum.

11) Að frátaldri aðlögun að framförum í tækni og vísindum, í samræmi við 12. gr. tilskipunar 2002/49/EB, ætti framkvæmdastjórnin að leitast við að aðlaga viðaukann á grundvelli reynslu aðildarríkjanna.

12) Einnig á að nota sameiginlegu matsaðferðirnar að því er varðar aðra löggjöf ESB ef vísað er til II. viðauka við tilskipun 2002/49/EB í þeirri löggjöf.

13) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 13. gr. tilskipunar 2002/49/EB.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Í stað II. viðauka við tilskipun 2002/49/EB komi texti viðaukans við þessa tilskipun.

2. gr.

1. Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til þess að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 31. desember 2018. Þau skulu þegar í stað senda framkvæmdastjórninni texta þessara ákvæða.

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 nær til.

3. gr.

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

([1]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2000/14/EB frá 8. maí 2000 um samræmingu laga aðildarríkjanna er varða hávaðamengun í umhverfinu af völdum búnaðar til nota utanhúss (Stjtíð. EB L 162, 3.7.2000, bls. 1).

([2]) Common Noise Assessment Methods in Europe (CNOSSOS-EU) — JRC Reference Report, EUR 25379 EN. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2012, — ISBN 978-92-79-25281-5

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 19. maí 2015.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Karmenu VELLA

Fyrir hönd forsetans,

framkvæmdastjóri.

———

[Viðaukinn er birtur í Stjórnartíðindum Evrópusambandsins L 168, 1.7.2015, bls. 4.]

REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/735 **2017/EES/74/15**

frá 14. febrúar 2017

um breytingu á viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni, í því skyni að laga hann að tækniframförum (efnareglurnar (REACH))(*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB ([1]), einkum 2. mgr. 13. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 ([2]) er að finna þær prófunaraðferðir sem skal beitt í þeim tilgangi að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif íðefna að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006.

2) Nauðsynlegt er að uppfæra reglugerð (EB) nr. 440/2008 til að bæta við nýjum og uppfærðum prófunaraðferðum sem Efnahags- og framfarastofnunin hefur nýlega samþykkt til að taka tillit til tækniframfara, og til að tryggja að dýrum sem eru notuð í tilraunaskyni sé fækkað, í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB ([3]). Haft var samráð við hagsmunaaðila um þessi drög.

3) Aðlögunin að tækniframförum felur í sér tuttugu prófunaraðferðir: eina nýja aðferð til að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, fimm nýjar og eina uppfærða prófunaraðferð til að meta visteiturhrif, tvær uppfærðar prófunaraðferðir til að meta umhverfisafdrif og -hegðun og fjórar nýjar og sjö uppfærðar prófunaraðferðir til að ákvarða áhrif á heilbrigði manna.

4) Efnahags- og framfarastofnunin endurskoðar reglulega viðmiðunarreglurnar sínar um prófanir til að finna þær sem eru úreltar frá vísindalega sjónarmiði. Í þessari aðlögun að tækniframförum falla sex prófunaraðferðir brott þar eð samsvarandi OECD-viðmiðunarreglur um prófanir hafa verið felldar úr gildi.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 112, 28.4.2017, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 171/2017 frá 22. september 2017 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1.

([2]) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 440/2008 frá 30. maí 2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) (Stjtíð. ESB L 142, 31.5.2008, bls.1).

([3]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB frá 22. september 2010 um vernd dýra sem eru notuð í vísindaskyni (Stjtíð. ESB L 276, 20.10.2010, bls. 33).

5) Því ætti að breyta reglugerð (EB) nr. 440/2008 til samræmis við það.

6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar sem komið var á fót skv. 133. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

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

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

Gjört í Brussel 14. febrúar 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

VIÐAUKI

Viðaukanum við reglugerð (EB) nr. 440/2008 er breytt sem hér segir:

1) Í A-hluta bætist eftirfarandi kafli við:

„A.25 **KLOFNUNARSTUÐLAR Í VATNI (AÐFERÐ MEÐ TÍTRUN — AÐFERÐ MEÐ LITRÓFSMÆLINGU — AÐFERÐ MEÐ LEIÐNIMÆLINGU)**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 112 um prófanir (1981).

Forsendur

— Viðeigandi greiningaraðferð

— Vatnsleysni

Leiðbeinandi upplýsingar

— Byggingarformúla

— Rafleiðni fyrir aðferð með leiðnimælingu

Hæfnifullyrðingar

— Framkvæma má allar prófunaraðferðir á hreinum efnum eða efnum af verslunarhreinleika Hafa skal í huga möguleg áhrif óhreininda á niðurstöður.

— Aðferðin með títrun hentar ekki fyrir efni með litla leysni (sjá „Prófunarlausnir“ hér á eftir).

— Aðferðin með litrófsmælingu á eingöngu við fyrir efni með merkjanlega ólík gleypniróf ÚF/sýnilegs ljóss fyrir klofin og óklofin form. Þessi aðferð getur einnig hentað fyrir efni með litla leysni og fyrir klofnun án tilstillis sýru/basa, t.d. flókið efnasamband.

— Í tilvikum þar sem Onsager-jafnan gildir er hægt að nota aðferðina með leiðnimælingu, jafnvel fyrir styrkleika sem eru í meðallagi lágir og jafnvel í tilvikum þar sem um er að ræða jafnvægi án tilstillis sýru/basa.

Stöðluð skjöl

Þessi prófunaraðferð grundvallast á aðferðum sem tilgreindar eru í tilvísunum sem taldar eru upp í liðnum „heimildir“ og í „Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA“ frá 18. ágúst 1978.

AÐFERÐ — INNGANGUR, TILGANGUR, GILDISSVIÐ, MIKILVÆGI, BEITING OG TAKMARKANIR PRÓFUNAR

Klofnun efnis í vatni er mikilvæg við mat á áhrifum þess á umhverfið. Hún stýrir formi efnisins sem aftur móti ákvarðar hegðun þess og flutning. Hún getur haft áhrif á ásog íðefnis á jarðveg og set og frásog í líffræðilegar frumur.

Skilgreiningar og einingar

Klofnun er skipting, sem getur gengið til baka, í tvö eða fleiri íðefnaform sem geta verið jónísk. Ferlinu er alla jafna lýst með

$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$

og jafnvægisfasti styrkleikans, sem stýrir efnahvarfinu, er

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Til dæmis, í því tiltekna tilviki þegar R er vetni (efnið er sýra), er fastinn

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[\mathrm{X}^-]}{[\mathrm{HX}]}$$

eða

$$pK_\alpha = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Viðmiðunarefni

Ekki þarf að nota eftirfarandi viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Þau eru aðallega gefin upp til að unnt sé að framkvæma kvörðun aðferðarinnar öðru hvoru og til að gefa tækifæri til að bera saman niðurstöður þegar önnur aðferð er notuð.

	pKa ([1])	Hitastig í °C
p-nítrófenól	7,15	25 ([1])
Bensósýra	4,12	20
p-klóranilín	3,93	20

([1]) Ekki liggur fyrir gildi fyrir 20 °C en gera má ráð fyrir að breytileiki niðurstaðna mælinga sé meiri en það hitastigshæði (e. *temperature dependence*) sem búast má við.

Hér kemur sér vel að vera með efni með nokkur pK-gildi eins og tilgreint er í meginreglu aðferðarinnar hér á eftir. Slíkt efni gæti verið:

Sítrónusýra	pK_a (8)	Hitastig í °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Meginregla prófunaraðferðarinnar

Efnafræðilega ferlið sem er lýst er alla jafna aðeins háð hitastigi að litlu leyti á viðkomandi umhverfishitasviði. Ákvörðunin á klofnunarstuðlinum útheimtir mælingu á styrk klofinna og óklofinna forma íðefnisins. Unnt er að ákvarða viðeigandi stuðul út frá þekkingu á massahlutfallareikningi klofnunarefnahvarfsins sem er tilgreint í skilgreiningum og einingum hér að framan. Í því tiltekna tilviki sem lýst er í þessari prófunaraðferð hegðar efnið sér sem sýra eða basi og ákjósanlegast er að framkvæma ákvörðunina með því að ákvarða hlutfallsstyrk jónaðra og ójónaðra forma efnisins og sýrustig lausnarinnar. Sambandið milli þessara hugtaka er gefið í jöfnu fyrir pK^a í skilgreiningum og einingum hér að framan. Sum efni sýna fleiri en einn klofnunarstuðul og hægt er að setja fram svipaðar jöfnur. Sumar aðferðanna sem hér er lýst henta einnig fyrir klofnun án tilstillis sýru/basa.

Gæðaviðmiðanir

Endurtekningarnákvæmni

Gera skal samhliða prófanir til að ákvarða klofnunarstuðul (a.m.k. þrjár ákvarðanir) að ± 0,1 lograeiningum.

LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐUNUM

Til eru tvær grundvallaraðferðir við að ákvarða pK_a. Önnur felur í sér að títra þekkt magn efnis með staðlaðri sýru eða stöðluðum basa, eins og við á; hin felur í sér að ákvarða hlutfallsstyrk jónaðra og ójónaðra forma og sýrustigshæði.

Undirbúningur

Hægt er að flokka aðferðir, sem grundvallast á þessum meginreglum, sem títrun, litrófsmælingar og leiðnimælingar.

Prófunarlausnir

Að því er varðar aðferðirnar með títrun og leiðnimælingu skal leysa íðefnið upp í eimuðu vatni. Að því er varðar litrófsmælingar og aðrar aðferðir eru notaðar jafnalausnir. Styrkur prófunarefnisins skal ekki vera hærri en 0,01 M eða helmingurinn af mettunarstyrknum, hvort sem er lægra, og nota skal hreinasta form efnisins sem er tiltækt til að tilreiða lausnirnar. Ef efnið er torleysanlegt má leysa það upp í litlu magni af vatnsblandanlegum leysi áður en því er bætt við í þeim styrkleika sem tilgreindur er hér að framan.

Athuga skal hvort lausnirnar innihalda ýrulausnir með því að nota Tyndall-geisla, einkum ef meðleysir hefur verið notaður til að auka leysni. Ef jafnalausnir eru notaðar ætti jafnastyrkurinn ekki að fara yfir 0,05 M.

Prófunarskilyrði

Hitastig

Hitastiginu skal haldið með a.m.k. ± 1 °C nákvæmni. Ákjósanlegt er að framkvæma ákvörðunina við 20 °C.

Ef grunur er um marktækt hitastigshæði skal framkvæma ákvörðunina við a.m.k. tvö önnur hitastig. Í því tilviki skal hitabilið vera 10 °C og hitastýring ± 0,1 °C.

Greininga

Aðferðin ræðst af eðli efnisins sem prófað er. Hún verður að vera nógu næm til að unnt sé að ákvarða ólíkar tegundir við hvern styrkleika prófunarlausnar.

Framkvæmd prófunarinnar

Aðferð með títrun

Prófunarlausnin er ákvörðuð með títrun með staðalbasa- eða sýrulausn, eins og við á, þar sem sýrustigið er mælt eftir hvert sinn sem títrunarlausn er bætt við. Bæta skal við a.m.k. 10 sinnum áður en jafngildispunktinum er náð. Ef jafnvægi næst nógu fljótt má nota síritandi spennudeili (e. *recording potentiometer)*. Fyrir þessa aðferð þurfa bæði heildarmagn efnis og styrkur þess vera nákvæmlega þekkt. Gera þarf varúðarráðstafanir til að útiloka koltvísýring. Nákvæmar upplýsingar um verklagsreglur, varúðarráðstafanir og útreikning er að finna í stöðluðum prófunum, t.d. 1.–4. heimild.

Aðferð með litrófsmælingu

Fundin er bylgjulengd þar sem jónuð og ójónuð form efnis eru með merkjanlega ólíka gleypnistuðla. Gleypniróf ÚF/sýnilegs ljóss fæst úr lausnum með stöðugum styrk við sýrustigsskilyrði þar sem efnið er fyrst og fremst ójónað og að fullu jónað og við nokkur sýrustig sem liggja þar á milli. Þetta er annað hvort unnt að gera með því að bæta við fleiri skömmtum af óblandaðri sýru (eða basa) í tiltölulega mikið magn af lausn efnisins í jafna með mörgum efnisþáttum, til að byrja með við hátt (lágt) sýrustig (5. heimild), eða með því að bæta jafnmiklu magni af stofnlausn efnisins, t.d. í vatni eða metanóli, í stöðugt magn ólíkra jafnalausna sem ná yfir æskilegt sýrustigsbil. Fullnægjandi mörg gildi fyrir pK_a eru reiknuð út frá sýrustigs- og frásogsgildum við valda bylgjulengd með því að nota gögn úr a.m.k. 5 sýrustigsgildum þar sem efnið er a.m.k. 10% og mest 90% jónað. Frekari upplýsingar um tilraunir og reikniaðferð er að finna í 1. heimild.

Aðferð með leiðnimælingu

Leiðni u.þ.b. 0,1 M af lausn efnisins í afjónuðu vatni er mæld með því að nota hólf með lítinn, þekktan hólfsfasta. Leiðni nokkurra nákvæmlega tilreiddra þynninga af þessari lausn er einnig mæld. Styrkurinn er helmingaður í hvert sinn og röðin skal a.m.k. ná yfir eitt tugaþrep í styrkleika. Mörk leiðni við ótakmarkaða þynningu fást með því að framkvæma svipaða tilraun með natríumsaltinu og framreikna. Síðan er hægt að reikna stig klofnunar út frá leiðni hverrar lausnar með því að nota Onsager-jöfnuna og þar af leiðandi er hægt að nota Ostwald-þynningarlögmálið (e. *Ostwald Dilution Law*) til að reikna út klofnunarstuðulinn sem $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, þar sem C er styrkur í mólum á hvern lítra og α er klofni þátturinn. Gera þarf varúðarráðstafanir til að útiloka koltvísýring. Frekari upplýsingar um tilraunir og reikniaðferð er að finna í stöðluðum textum og 1., 6. og 7. heimild.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Aðferð með títrun

pK_a er reiknaður út fyrir 10 mælda punkta á títrunarkúrfunni. Meðaltal og staðalfrávik slíkra pK_a-gilda eru reiknuð út. Línurit fyrir sýrustig á móti magni staðalbasa eða -sýru skal fylgja ásamt framsetningu í töflu.

Aðferð með litrófsmælingu

Gleypni og sýrustig fyrir hvert gleypniróf eru sett upp í töflu. Reiknuð eru a.m.k. fimm gildi fyrir pK_a út frá milliliggjandi gagnapunktum í rófinu og meðaltal og staðalfrávik þessara niðurstaðna eru einnig reiknuð út.

Aðferð með leiðnimælingu

Jafngildi leiðni Λ er reiknað út fyrir hvern sýrustyrk og fyrir hvern styrkleika blöndu úr einu jafngildi af sýru að viðbættu 0,98 jafngildi af karbónatlausu natríumhýdroxíði. Of mikið er af sýru til að koma í veg fyrir of mikið OH^- vegna vatnsrofs. $1/\Lambda$ er teiknað á móti $\sqrt{C}$ og hægt er að finna Λ_o fyrir saltið með því að framreikna að styrk núll.

Hægt er að reikna út Λ_o fyrir sýruna með því að nota gildi úr heimildum fyrir H^+ og Na^+. Hægt er að reikna pK_a út frá $\alpha = \Lambda_i/\Lambda_o$ og $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ fyrir hvern styrkleika. Hægt er að ná betri gildum fyrir K_a með því að leiðrétta fyrir hreyfanleika og virkni. Reikna skal meðaltal og staðalfrávik fyrir pK_a-gildin.

Prófunarskýrsla

Öll óunnin gögn og reiknuð pK_a-gildi skulu lögð fram ásamt reikniaðferð (helst í töfluformi, eins og lagt er til í 1. heimild), og sama gildir um tölfræðilegu breyturnar sem lýst er hér að framan. Að því er varðar aðferðir með títrun skal gefa nákvæmar upplýsingar um stöðlun títrunarlausna.

Að því er varðar aðferðina með litrófsmælingu skal leggja fram öll róf. Að því er varðar aðferðina með leiðnimælingu skal gera grein fyrir nákvæmum upplýsingum um ákvörðun á hólfsfasta. Gefa skal upplýsingar um tæknina sem notuð er, greiningaraðferðir og eðli allra jafna sem notaðir eru.

Gera skal grein fyrir prófunarhitastiginu eða -hitastigunum.

HEIMILDIR:

1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.

2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (see above (4)).

8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).'

2) Í stað kafla B.5 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.5 **BRÁÐ AUGNERTING/AUGNÆTING**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir (2012). OECD-viðmiðunarreglur um prófanir á íðefnum eru endurskoðaðar reglulega til að tryggja að þær endurspegli bestu, fyrirliggjandi vísindi. Við fyrri endurskoðanir á þessum viðmiðunarreglum um prófanir var sérstaklega hugað að því hvort unnt væri að bæta þær með því að meta allar fyrirliggjandi upplýsingar um prófunaríðefni til að komast hjá ónauðsynlegum prófunum á tilraunadýrum og taka þannig tillit til velferðar dýra. Í OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir (samþykkt 1981 og uppfærð 1987, 2002 og 2012) er mælt með því að fram fari greining á vægi rökstuddra vísbendinga (1. heimild) í fyrirliggjandi gögnum sem málið varða áður en hafin er prófun í lífi, eins og hér er lýst, á bráðri augnertingu eða augnætingu. Ef fyrirliggjandi 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 viðbót við þessa prófunaraðferð. Að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) ([1]) innihalda viðeigandi leiðbeiningar Efnastofnunar Evrópu (21. heimild) einnig samþætta prófunaráætlun. Prófun á dýrum skal einungis framkvæma ef ákvarðað er að hún sé nauðsynleg að lokinni athugun á tiltækum staðgönguaðferðum og notkun þeirra er talin við hæfi. Þegar drög að þessari uppfærðu prófunaraðferð voru samin var notkun þessarar prófunaraðferðar ennþá nauðsynleg í sumum tilvikum eða gerð krafa um hana samkvæmt tilteknum reglurömmum.

Í síðustu uppfærslu var lögð megináhersla á notkun kvalastillandi lyfja og deyfilyfja án þess að hafa áhrif á grunnhugtak og uppbyggingu viðmiðunarreglunnar um prófanir. Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) ([2]) og óháður alþjóðlegur vísindaritrýnihópur yfirfóru gagnsemi og takmarkanir þess að nota að jafnaði deyfilyf til staðbundinnar notkunar, altæk kvalastillandi lyf og mannúðlega endapunkta við öryggisprófun í lífi á augnertingu (12. heimild). Í yfirferðinni var komist að þeirri niðurstöðu að með notkun á deyfilyfjum til staðbundinnar notkunar og altækum kvalastillandi lyfjum væri hægt, að mestu eða öllu leyti, að komast hjá sársauka og þjáningu án þess að hafa áhrif á niðurstöðu prófunarinnar og mælt með því að þessi efni skyldu alltaf notuð. Þessi yfirferð er tekin til greina í þessari prófunaraðferð. Að jafnaði skal nota deyfilyf til staðbundinnar notkunar, altæk kvalastillandi lyf og mannúðlega endapunkta við prófanir í lífi á bráðri augnertingu og augnætingu. Ef veittar eru undanþágur frá notkun þeirra ber að rökstyðja það. Mildunin, sem lýst er í þessari aðferð, mun draga verulega úr eða koma í veg fyrir sársauka og þjáningu dýra í flestum prófunaraðstæðum þar sem prófun í lífi m.t.t. þess hvort efnið er öruggt fyrir augu er ennþá nauðsynleg.

Jöfn, fyrirbyggjandi verkjameðferð skal fela í sér i) venjubundna formeðhöndlun með deyfilyfi til staðbundinnar notkunar (t.d. próparakaíni eða tetrakaíni) og altæku kvalastillandi lyfi (t.d. búprenorfíni), ii) venjubundna eftirmeðferðaráætlun með altækri verkjastillingu (t.d. búprenorfíni og meloxíkami), iii) tímasetta athugun, vöktun og skráningu á dýrum m.t.t. klínískra einkenna um sársauka og/eða þjáningu og iv) tímasetta athugun, vöktun og skráningu á eðli, alvarleika og þróun allra augnskemmda. Frekari upplýsingar eru gefnar í uppfærðu verkferlunum sem lýst er hér á eftir. Eftir að prófunaríðefni er borið á skal ekki gefa meira af deyfilyfjum til staðbundinnar notkunar eða altækum kvalastillandi lyfjum til að komast hjá truflunum á rannsókninni. Ekki skal bera kvalastillandi lyf með bólgueyðandi verkan (t.d. meloxíkam) staðbundið á og skammtar, sem eru notaðir kerfisbundnir, skulu ekki trufla áhrif á augu.

Skilgreiningar eru settar fram í viðbætinum við prófunaraðferðina.

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB (Stjtíð. ESB L 304, 22.11.2007, bls. 1).

([2]) The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki huga að prófun í lífi fyrr en búið er að meta öll fyrirliggjandi gögn sem varða hugsanleg ætandi eða ertandi áhrif íðefnisins á augu og er það gert með greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga. Þessi gögn eru m.a. rökstuddar vísbendingar úr fyrirliggjandi rannsóknum á mönnum og/eða tilraunadýrum, rökstuddar vísbendingar um ætandi eða ertandi áhrif eins eða fleiri efna með skylda byggingu eða blandna slíkra efna á augu, gögn sem sýna að íðefnið 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 augnætingu/-ertingu (6. heimild og 13.–17. heimild). Rannsóknirnar kunna að hafa farið fram á undan greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga eða verið afleiðing slíkrar greiningar.

Að því er varðar tiltekin íðefni getur slík greining sýnt að þörf er á rannsóknum í lífi á augnætingar- eða augnertingarmætti íðefnisins. Í öllum slíkum tilvikum skal helst framkvæma rannsókn í glasi og/eða í lífi á húðætingaráhrifum íðefnisins og meta þessi áhrif í samræmi við raðprófunaráætlunina í prófunaraðferð B.4 (7. heimild) eða samþættu prófunaráætlunina sem lýst er í leiðbeiningum Efnastofnunar Evrópu (21. heimild) áður en til greina kemur að gera augnprófun í lífi.

Raðprófunaráætlun, sem felur í sér fullgiltar prófanir á augnætingu/-ertingu í glasi eða utan lífs, er birt sem viðbót við þessa prófunaraðferð og, að því er varðar efnareglugerðina (REACH), í leiðbeiningum Efnastofnunar Evrópu (21. heimild). Mælt er með því að slíkri prófunaráætlun sé fylgt áður en prófun í lífi hefst. Þegar um er að ræða ný íðefni er mælt með þrepskiptri prófunaraðferð við öflun traustra, vísindalegra gagna um ætingar- eða ertingareiginleika íðefnisins. Ef gögn um ætandi eða ertandi áhrif fyrirliggjandi íðefna á húð eða augu eru ófullnægjandi er hægt að nota áætlunina til að fylla í gagnaeyðurnar. Ef vikið er frá prófunaráætlun eða -aðferð eða ef ákveðið er að nota ekki þrepskipta prófunaraðferð ber að rökstyðja það.

MEGINREGLA PRÓFUNAR Í LÍFI

Í kjölfar formeðhöndlunar með altæku kvalastillandi lyfi og áburðar á viðeigandi deyfilyfi til staðbundinnar notkunar er íðefnið sem á að prófa borið í einum skammti í annað auga tilraunadýrsins en ómeðhöndlaða augað er notað til samanburðar. Umfang augnertingar og augnætingar er metið með því að gefa stig eftir ákveðnum kvarða fyrir skemmdir í slímhúð, glæru (hornhimnu) og lithimnu augans. Öðrum áhrifum á augu og skaðlegum, altækum áhrifum er einnig lýst til að gefa heildarmynd af áhrifunum. Rannsóknin þarf að ná yfir nógu langan tíma til að unnt sé að meta hvort áhrifin geti gengið til baka eða séu varanleg.

Dýr sem sýna merki um mikla þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar eða vefjaskemmdir, sem eru í samræmi við mannúðlegu endapunktana sem lýst er í þessari prófunaraðferð (sjá 26. lið), skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og íðefnið metið í samræmi við þetta. Viðmiðanir fyrir ákvörðun um mannúðlega aflífun dauðvona og sárþjáðra dýra eru viðfangsefni leiðbeiningarskjals Efnahags- og framfarastofnunarinnar (8. heimild).

UNDIRBÚNINGUR FYRIR PRÓFUN Í LÍFI

Val á dýrategund

Kanínuhvítingjar eru ákjósanlegustu tilraunadýrin og skal nota heilbrigð, ung, fullvaxin dýr. Ef notaðir eru aðrir stofnar eða önnur dýrategund skal það rökstutt.

Dýrin undirbúin

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

Aðbúnaður og fóðrun

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 (±3) ºC) þegar um kanínur er að ræða. 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 birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Forðast skal óhóflegan ljósstyrk. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

PRÓFUNARAÐFERÐ

Notkun á deyfilyfjum til staðbundinnar notkunar og altækum kvalastillandi lyfjum

Mælt er með eftirfarandi verkferlum til að komast hjá eða lágmarka sársauka og þjáningu í aðferðum við prófun á því hvort efni er öruggt fyrir augu. Í þeirra stað mega koma annars konar verkferlar sem sýnt hefur verið fram á að eru jafngóðir eða betri til að komast hjá eða lina sársauka og þjáningu.

— Klukkustund áður en prófunaríðefnið er borið á er búprenorfín, 0,01 mg/kg, gefið með innsprautun undir húð til að veita altæka verkjastillingarmeðhöndlun. Ekki er vitað til eða búist við að búprenorfín og önnur svipuð kvalastillandi ópíumefni, sem gefin eru kerfisbundið, breyti augnsvörun (12. heimild).

— Fimm mínútum áður en prófunaríðefnið er borið á eru einn eða tveir dropar af augndeyfilyfi til staðbundinnar notkunar (t.d. 5% próparakaínhýdróklóríð eða 0,5% tetrakaínhýdróklóríð) settir í hvort auga. Til að komast hjá hugsanlegri truflun á rannsókninni er mælt með deyfilyfi til staðbundinnar notkunar sem inniheldur ekki rotvarnarefni. Það auga í hverju dýri sem er ekki meðhöndlað með prófunaríðefni heldur með deyfilyfjum til staðbundinnar notkunar er notað til samanburðar. Ef búist er við að prófunaríðefnið valdi verulegum sársauka og þjáningu ætti að jafnaði ekki að prófa það í lífi. Ef vafi leikur á um það eða ef prófun er nauðsynleg skal þó íhuga að gefa deyfilyf til staðbundinnar notkunar aukalega með 5 mínútna millibili áður en prófunaríðefnið er borið á. Notendur þurfa að hafa í huga að margir skammtar af deyfilyfjum til staðbundinnar notkunar geta hugsanlega haft í för með sér hægari aukningu á alvarleika vefjaskemmda og/eða að lengri tíma þurfi til að vefjaskemmdir af völdum íðefna hverfi.

— Átta klukkustundum eftir að prófunaríðefnið er borið á eru búprenorfín, 0,01 mg/kg, og meloxíkam, 0,5 mg/kg, gefin með innsprautun undir húð til að veita áframhaldandi altæka verkjastillingarmeðhöndlun. Þó að engin gögn bendi til þess að meloxíkam hafi bólgueyðandi áhrif á augað þegar það er gefið með innsprautun undir húð einu sinni á dag skal ekki gefa meloxíkam fyrr en a.m.k. 8 klukkustundum eftir að prófunaríðefnið er borið á til að komast hjá öllum hugsanlegum truflunum á rannsókninni (12. heimild).

— Að fyrstu 8 klukkustundunum liðnum eftir að prófunaríðefnið er borið á skal gefa búprenorfín, 0,01 mg/kg, með innsprautun undir húð á 12 klukkustunda fresti ásamt meloxíkami, 0,5 mg/kg, með innsprautun undir húð á 24 klukkustunda fresti þar til augnskemmdir ganga til baka og engin klínísk einkenni um sársauka og þjáningu eru fyrir hendi. Til eru hæglosandi efnablöndur kvalastillandi lyfja sem koma til álita til að draga úr tíðni skömmtunar með kvalastillandi lyfjum.

— Gefa skal „björgunar“verkjastillingu tafarlaust eftir að prófunaríðefnið er borið á ef fyrirbyggjandi verkjastilling og deyfilyf til staðbundinnar notkunar eru ófullnægjandi. Ef dýr sýnir merki um sársauka og þjáningu við rannsóknina ætti án tafar að gefa „björgunar“skammt af búprenorfíni, 0,03 mg/kg, með innsprautun undir húð og endurtaka það á allt að 8 klukkustunda fresti, ef nauðsyn krefur, í stað 0,01 mg/kg með innsprautun undir húð á 12 klukkustunda fresti. Meloxíkam, 0,5 mg/kg, er gefið með innsprautun undir húð á 24 klukkustunda fresti ásamt „björgunar“skammti af búprenorfíni en ekki fyrr en a.m.k. 8 klukkustundum eftir að prófunaríðefnið er borið á.

Prófunaríðefninu dreypt í auga

Prófunaríðefnið er sett í slímhúðarpoka annars augans á hverju dýri eftir að neðra augnlokið hefur verið togað varlega frá auganu. Augnlokunum er síðan haldið varlega saman í u.þ.b. eina sekúndu til þess að koma í veg fyrir að efnið renni út. Ómeðhöndlaða augað er notað til samanburðar.

Skolun

Ekki má skola augu tilraunadýranna í a.m.k. 24 klukkustundir eftir ídreypingu með prófunaríðefninu nema um sé að ræða föst efni (sjá 18. lið) eða ef ætandi eða ertandi áhrif koma strax fram. Eftir 24 klukkustundir má skola augun 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. tími skolunar, samsetning og hitastig skolvökvans, hversu lengi skolun varir og rúmmál og hraði ídreypingar.

Skammtastærð

1) *Prófun vökva*

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

2) *Prófun fastra efna*

Við prófun á föstum efnum, maukkenndu efni og íðefnisögnum skal sýnið vera 0,1 ml að rúmmáli eða í mesta lagi 100 mg að þyngd. Prófunaríðefnið skal mulið í fíngert duft. Rúmmál fastra efna skal mælt eftir að þeim hefur verið þjappað varlega saman, t.d. með því að slá laust á mæliílátið. Ef fasta prófunaríðefnið 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.

3) *Prófun úðaefna*

Mælt er með því að öllum úðadæluvökva og úðaefnum sé safnað í annað ílát áður en þeim er dreypt í augað. Eina undantekningin frá þessu eru íðefni í þrýstiúðabrúsum en ekki er hægt að safna þeim í annað ílát vegna uppgufunar. Í því tilviki skal halda auganu opnu og úða prófunaríðefninu í augað í einni lotu, sem varir í u.þ.b. eina 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: íðefninu 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 íðefnin eru rokgjörn má áætla skammtinn með því að vigta viðtökuílátið áður en og eftir að prófunaríðefnið er tekið úr því.

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

Eindregið er mælt með því að prófun í lífi sé í upphafi aðeins gerð með einu dýri (sjá viðbótina við þessa prófunaraðferð: Raðprófunaráætlun fyrir augnertingu og augnætingu). Athuganir skulu gera kleift að ákvarða alvarleika og hvort skaðinn gangi til baka áður en haldið er áfram og staðfestingarprófun gerð á öðru dýri.

Ef niðurstöðurnar úr þessari prófun sýna að íðefnið er ætandi eða mjög ertandi fyrir augað, þegar fylgt er verkferlinu sem lýst var, skal ekki gera frekari augnertingarprófanir.

Staðfestingarprófun (augnertingarprófun í lífi á fleiri dýrum til viðbótar)

Komi ekki fram ætandi eða mjög ertandi áhrif í upphafsprófuninni skal staðfesta ertandi eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum. Komi fram ertandi áhrif í upphafsprófuninni er mælt með því að staðfestingarprófunin sé raðprófun með einu dýri í einu fremur en að láta tvö dýr til viðbótar verða samtímis fyrir váhrifum. Ef ætandi eða mjög ertandi verkun kemur fram hjá seinna dýrinu er prófuninni ekki haldið áfram. Ef niðurstöður hjá seinna dýrinu nægja til að unnt sé að taka ákvörðun um hættuflokkun skal ekki gera frekari prófanir.

Athugunartímabil

Athugunartímabilið þarf að vera nógu langt til að unnt sé að meta til fulls umfang þeirra áhrifa, sem vart verður, og hvort þau geti gengið til baka. Tilrauninni skal þó hætt um leið og dýrið sýnir merki um mikinn sársauka eða þjáningu (8. heimild). Alla jafna skal fylgst með dýrunum 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.

Klínískar athuganir og flokkun augnsvörunar

Meta skal augun ítarlega m.t.t. þess hvort augnskemmdir eru fyrir hendi eða ekki einni klukkustund eftir að prófunaríðefnið er borið á og síðan a.m.k. daglega. Meta skal dýrin nokkrum sinnum á dag fyrstu þrjá dagana til að tryggja að ákvarðanir um lok prófunar séu teknar tímanlega. Tilraunadýrin skulu metin reglubundið allan tímann sem rannsóknin stendur yfir m.t.t. klíníska einkenna um sársauka og/eða þjáningu (t.d. dýrin krafsa endurtekið í augað eða nudda það, depla augunum í sífellu, tárfella í sífellu) (9.–11. heimild) a.m.k. tvisvar á dag með a.m.k. 6 klukkustunda millibili milli athugana eða oftar ef nauðsyn krefur. Þetta er nauðsynlegt til að i) meta á fullnægjandi hátt hvort dýrin sýna merki um sársauka og þjáningu til þess að taka upplýstar ákvarðanir um hvort auka þurfi skammt kvalastillandi lyfja og ii) meta hvort dýrin sýni merki um ákvarðaða mannúðlega endapunkta til þess að taka upplýstar ákvarðanir um hvort rétt þyki að aflífa dýrin á mannúðlegan hátt og til að tryggja að slíkar ákvarðanir séu teknar tímanlega. Að jafnaði skal nota litun eftir flúrskinslausn og nota raufarlampa með augnsjá þegar það telst viðeigandi (t.d. til að meta dýpt áverka þegar sáramyndun á glæru er fyrir hendi) til að auðvelda greiningu og mælingu á augnskemmd og til að meta hvort ákvarðaðar endapunktaviðmiðanir fyrir aflífun á mannúðlegan hátt hafi verið uppfylltar. Hægt er að taka stafrænar myndir af vefjaskemmdum, sem koma fram, til viðmiðunar og til að skrá umfang augnskemmda á varanlegan hátt. 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 íðefnið metið í samræmi við þetta.

Aflífa skal dýr á mannúðlegan hátt hafi þau fengið eftirfarandi augnskemmdir eftir ídreypingu (sjá lýsingu á stigum vefjaskemmda í töflu 1): göt á glæru eða umtalsverða sáramyndun á glæru, þ.m.t. bungun, blóð í fremra hólfi augans, 4. stigs ógagnsæi glæru, enga ljóssvörun (2. stigs lithimnusvörun) sem varir í 72 klukkustundir, sáramyndun á táru, drep í táru eða blikhimnu eða myndun drepvefjar. Ástæðan er sú að venjulega ganga þessar vefjaskemmdir ekki til baka. Enn fremur er mælt með því að eftirtaldar augnskemmdir séu notaðar sem mannúðlegir endapunktar til að hætta rannsóknum áður en tímasetta 21. dags athugunartímabilinu lýkur. Þessar vefjaskemmdir teljast hafa forspárgildi um mjög ertandi eða ætandi skemmdir og skemmdir sem ekki er búist við að gangi alveg til baka áður en 21. dags athugunartímabilinu lýkur: mjög djúpar skemmdir (t.d. sáramyndun á glæru sem nær inn fyrir yfirborðslög uppistöðuvefs), eyðilegging á glærubrún > 50% (eins og sést á upplitun táruvefs) og alvarleg augnsýking (graftarlosun). Sambland af: æðun á yfirborði glæru (þ.e. æðavagl á glæru), flúrskinslausnarlitunarsvæði minnkar ekki með tímanum, byggt á daglegu mati, og/eða endurþekjun (e. *re-epithelialisation*) vantar 5 dögum eftir ídreypingu prófunaríðefnis, gæti hugsanlega einnig talist gagnleg viðmiðun til að hafa áhrif á klíníska ákvörðun um að hætta rannsókn snemma. Þessar niðurstöður eru þó ekki nægilegar, hver fyrir sig, til að rökstyðja að hætta rannsókn snemma. Þegar alvarleg áhrif á augu hafa greinst skal hafa samráð um klíníska rannsókn við dýralækninn sem annast dýrin (e. *attending veterinarian*) eða dýralækni, sem hefur réttindi og hæfi til að sinna tilraunadýrum, eða starfsfólk, sem hefur hlotið þjálfun til að greina klíníska vefjaskemmdir, til að ákvarða hvort sambland þessara áhrifa gefi tilefni til þess að hætta rannsókn snemma. Stig augnsvörunar (í slímhimnu, glæru og lithimnu) skulu fengin og skráð 1, 24, 48 og 72 klukkustundum eftir ídreypingu prófunaríðefnis (tafla 1). Ekki má aflífa dýr, sem ekki fá augnskemmdir, fyrr en þremur dögum eftir ídreypingu. Fylgjast skal með dýrum með augnskemmdir, sem eru ekki alvarlegar, þar til augnskemmdirnar hverfa, eða í 21 dag, og skal rannsókninni þá hætt. Athuganir skulu gerðar og skráðar a.m.k. eftir 1 klukkustund, 24 klukkustundir, 48 klukkustundir, 72 klukkustundir, 7 daga, 14 daga og 21 dag til að ákvarða umfang skemmdanna og hvort þær geti gengið til baka eða ekki. Athuganir skulu gerðar oftar ef nauðsyn krefur til að ákvarða hvort eigi að aflífa tilraunadýrið af mannúðarástæðum eða taka það úr rannsókninni vegna neikvæðra niðurstaðna.

Skrá skal stig augnskemmda við hverja athugun (sjá töflu 1). Einnig skal skýra frá öðrum skemmdum á auga (s.s. æðavagli á glæru, litun, breytingum á fremra augnhólfi) eða skaðlegum, altækum verkunum.

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

Flokkun augnsvörunar er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á flokkun augnsvörunar 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.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

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 íðefnis þar eð önnur áhrif prófunaríðefnisins 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.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Rökstuðningur fyrir prófun í lífi: greining á vægi rökstuddra vísbendinga 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. ítarleg lýsing á þeim verkferlum, sem voru notuð, og niðurstöðum sem fengust með prófunar- og viðmiðunaríðefnum,

— lýsing á húðertingar- eða húðætingarrannsókninni í lífi sem var gerð, þ.m.t. niðurstöðurnar sem fengust,

— greiningin á vægi rökstuddra vísbendinga sem lá til grundvallar rannsókninni í lífi.

Prófunaríðefni:

— auðkennisgögn (t.d. efnaheiti og CAS-númer, liggi það fyrir, hreinleiki, þekkt óhreinindi, uppruni, lotunúmer),

— eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. sýrustig, rokgirni, leysni, stöðugleiki og hvarfgirni við vatn),

— ef um er að ræða blöndu skal greina efnisþætti, þ.m.t. auðkennisgögn fyrir innihaldsefni efna (t.d. efnaheiti og CAS-númer, liggi þau fyrir), og styrk þeirra,

— áburðarskammtur.

Burðarefni:

— auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,

— rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð og ef notuð eru 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.

Deyfilyf og kvalastillandi lyf

— skammtar og tímasetningar þegar deyfilyf til staðbundinnar notkunar og altæk kvalastillandi lyf voru gefin,

— ef notað er staðdeyfilyf: auðkenni, hreinleiki, tegund og hugsanleg víxlverkun við prófunaríðefnið.

Niðurstöður:

— lýsing á aðferð til að meta ertingu til stiga á hverjum athugunartíma (t.d. færanlegur raufarlampi, augnsjá og 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 augnskemmdum (t.d. æðun, myndun æðavagls á glæru, samgróningar og litun),

— lýsing á staðbundnum og skaðlegum, altækum áhrifum utan augans sjálfs, skrár yfir klínísk einkenni sársauka og þjáningar, stafrænar myndir og vefjameinafræðilegar niðurstöður, ef einhverjar eru.

Umfjöllun um niðurstöður.

Túlkun niðurstaðna

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

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

HEIMILDIR:

1) Barratt, M.D., *et al*. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 - 429.

2) de Silva, O., et al. (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 - 164.

3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

4) Young, J.R., et al. (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., et al. (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, pp.483 - 524.

7) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/húðæting.

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://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

13) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: mæling á rafviðnámi gegnum húð (TER).

14) Kafli B.40a í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: prófun með húðlíkani manns.

15) OECD (2006), Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

16) Kafli B.47 í þessum viðauka, BCOP-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á ógagnsæi og gegndræpi glæru úr nautgrip) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.

17) Kafli B.48 í þessum viðauka, ICE-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á einangruðu auga úr kjúklingi) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.

18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

20) EC (2008), Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006 (OJ L 353, 31.12.2008, p. 1).

21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Tafla 1

Flokkun augnskemmda

Glæra	Stig
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 lítillega), smáatriði í lithimnu eru mjög greinileg	1
Auðgreinanlegt, hálfgagnsætt svæði, smáatriði í lithimnu örlítið óskýr	2
Perlumóðurlitað svæði, smáatriði í lithimnu ekki greinanleg, erfitt er að meta stærð sjáaldurs	3

Glæra	Stig
Ógagnsæ glæra, lithimnan ógreinanleg vegna ógagnsæis	4
Hámarksgildi: 4	
Lithimna	
Eðlileg	0
Merkjanlega dýpri fellingar, vökvasókn, bólga, blóðsöfnun í kringum glæruna í meðallagi eða mikil blóðfylling smáæða, lithimna bregst við ljósi (litið er á hægt viðbragð sem áhrif)	1
Blæðing, stórsæjar skemmdir, engin svörun við ljósi	2
Hámarksgildi: 2	
Tára	
Roði (hér er átt við slímhúð augnloks og táru 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	
Tárubjúgur	
Bólga (hér er átt við augnlok og/eða blikhimnu)	
Eðlileg	0
Dálítil bólga umfram það sem er eðlilegt	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	
(*) Skrá skal stærð svæðisins þar sem glæran er ógagnsæ	

Viðbætir

SKILGREININGAR:

Sýru-/basaforði: Að því er varðar súrar efnablöndur er þetta það magn (g) natríumhýdroxíðs/100 g af efnablöndu sem þarf til að mynda tiltekið sýrustig. Að því er varðar basískar efnablöndur er þetta það magn (g) natríumhýdroxíðs sem svarar til þess magns (g) brennisteinssýru/100 g af efnablöndu sem þarf til að mynda tiltekið sýrustig (Young o.fl. 1988).

Íðefni: Efni eða blanda.

Efni sem eru ekki ertandi: Efni sem flokkast ekki sem augnertandi í I., II. eða III. undirflokk EPA eða augnertandi í HSK-undirflokk 1, 2, 2A eða 2B eða í ESB-undirflokk 1 eða 2 (17.–19. heimild).

Augnætandi efni: a) Íðefni sem veldur vefjaskemmdum í auga sem ganga ekki til baka, b) íðefni sem flokkast sem augnertandi í 1. undirflokk HSK eða 1. undirflokk EPA eða ESB-undirflokk 1 (17.–19. heimild).

Augnertandi efni: a) Íðefni sem framkallar breytingu í auga sem gengur til baka, b) íðefni sem flokkast sem augnertandi í II. eða III. undirflokk EPA eða HSK-undirflokk 2, 2A eða 2B eða ESB-undirflokk 2 (17.–19. heimild).

Mjög augnertandi efni: a) Íðefni sem veldur vefjaskemmdum í auga sem ganga ekki til baka innan 21 dags frá ídreypingu, eða sem veldur alvarlegri sjónskerðingu, b) íðefni sem flokkast sem augnertandi efni í 1. undirflokk HSK eða I. undirflokk EPA eða ESB-undirflokk 1 (17.–19. heimild).

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Stigskipt aðferð: Þrepskipt prófunaráætlun þar sem allar upplýsingar um prófunaríðefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

Vægi rökstuddra vísbendinga (ferli): Styrkleikar og veikleikar upplýsinga sem safnað hefur verið eru notaðir sem grundvöllur niðurstöðu sem er e.t.v. ekki augljós á grundvelli einstakra gagna.

———

VIÐBÓT VIÐ PRÓFUNARAÐFERÐ B.5 ([1])

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 lágmarka prófanir sem líklegt er að kalli fram mikla svörun hjá dýrum. Allar upplýsingar um íðefni, sem varða hugsanlega augnertingar- eða augnætingareiginleika þess, skulu metnar áður en hugað er að prófun í lífi. Hugsanlegt er að þegar liggi fyrir nægilegar upplýsingar til að flokka viðkomandi prófunaríðefni með tilliti til augnertingar- eða augnætingarmáttar þess án þess að gera þurfi prófanir á tilraunadýrum. Greining á vægi rökstuddra vísbendinga og notkun raðprófunaráætlunar lágmarka því þörfina á prófun í lífi, einkum ef íðefnið er líklegt til að kalla fram mikla svörun.

Mælt er með því að fram fari greining á vægi rökstuddra vísbendinga til að meta fyrirliggjandi upplýsingar um augnertingar- og augnætingarmátt íðefna í því skyni 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 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 augnætingar- eða augnertingarmátt efnanna. Upphaflega prófunaráætlunin, sem lýst er í þessari viðbót, var samin á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (1. heimild). Hún var síðar staðfest og aukin fyrir samræmda og samþætta kerfið til hættuflokkunar á áhrifum íðefna á heilbrigði manna og umhverfið, sem var samþykkt á 28. sameiginlega fundi íðefnanefndar og íðefnavinnuhóps stofnunarinnar í nóvember 1998 (2. heimild), og uppfærð af sérfræðingahópi Efnahags- og framfarastofnunarinnar á árinu 2011.

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 vægi rökstuddra vísbendinga notuð sem aðferð til að meta fyrirliggjandi gögn um augnertingar- eða augnætingareiginleika íðefna og stigskipt aðferð notuð til að afla viðeigandi gagna um íðefni 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 rannsóknir samkvæmt aðferð TM B.4. við tilteknar aðstæður (3. og 4. heimild).

Lýsing á þrepskiptri prófunaráætlun

Áður en gerðar eru prófanir, sem eru hluti af raðprófunaráætlun (sjá mynd), skal meta allar fyrirliggjandi upplýsingar til að ákvarða þörfina á augnprófun í lífi. Vera kann að afla megi mikilvægra upplýsinga með mati á einstökum áhrifaþáttum (t.d. mjög háu eða mjög lágu sýrustigi) en þó ber að meta allar fyrirliggjandi upplýsingar í heild sinni. Öll viðeigandi gögn um áhrif íðefnisins, sem um er að ræða, og áhrif íðefna með hliðstæða byggingu skulu metin þegar tekin er ákvörðun á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga og skal rökstyðja ákvörðunina. Leggja skal megináherslu á fyrirliggjandi gögn um áhrif íðefnisins 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 íðefnum. Eftirfarandi atriði skulu m.a. tekin til greina í prófunaráætluninni:

Mat á fyrirliggjandi gögnum um áhrif á menn og/eða dýr og/eða gögnum rannsókna í glasi úr fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum (1. þrep).

([1]) Að því er varðar notkun á samþættri prófunaráætlun vegna augnertingar samkvæmt efnareglugerðinni (REACH), sjá einnig „Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance“ frá Efnastofnun Evrópu http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Fyrst skal skoða fyrirliggjandi gögn um áhrif á menn, t.d. úr klínískum rannsóknum og rannsóknum á starfsumhverfi og tilfellaskýrslur og/eða gögn úr augnrannsóknum á dýrum og/eða gögn rannsókna í glasi úr fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum fyrir augnertingu/augnætingu, þar eð þessi gögn veita beinar upplýsingar um áhrif á augu. Því næst skal meta fyrirliggjandi gögn úr rannsóknum á mönnum og/eða dýrum þar sem húðæting eða húðerting var könnuð og/eða úr rannsóknum í glasi úr fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum fyrir húðætingu. Hvorki skal setja íðefni með þekkta ætingareiginleika eða mjög ertandi eiginleika í augu dýra né íðefni sem hafa ætandi eða mjög ertandi áhrif á húð; litið skal svo á að slík efni hafi einnig ætandi og/eða ertandi áhrif á augu. Ekki skal heldur prófa íðefni í augnrannsóknum í lífi ef fullnægjandi sannanir hafa fengist fyrir því í fyrri augnrannsóknum að þau séu óætandi og óertandi.

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 áhrif á menn og/eða dýr frá efnum með skylda byggingu eða blöndum slíkra efna og gögnin nægja til að sýna augnætingar- eða augnertingarmátt þeirra má ganga út frá því að prófunaríðefnið framkalli sömu svörun. Í slíkum tilvikum þarf e.t.v. ekki að prófa íðefnið. Neikvæð gögn úr rannsóknum á efnum með skylda efnabyggingu eða blöndum slíkra efna eru ekki næg sönnun, samkvæmt raðprófunaráætluninni, fyrir því að tiltekið íðefni sé óætandi eða óertandi. Nota skal fullgiltar og viðurkenndar aðferðir með venslum efnabyggingar og virkni til að sanngreina ætingar- og ertingarmátt, bæði að því er varðar áhrif á húð og augu.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar og hvarfgirni (3. þrep).

Íðefni 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 til að staðfesta að íðefni er augnætandi eða augnertandi er eðlilegt að skoða einnig sýru- eða basaforða (jafnarýmd) efnisins (5.–7. heimild). Ef jafnarýmdin gefur til kynna að íðefnið sé ekki augnætandi (t.d íðefni með óvenjuhátt sýrustig og lítinn sýru-/basaforða) skal gera frekari prófanir til að staðfesta þetta og er ákjósanlegast að nota fullgilta og viðurkennda prófun í glasi eða utan lífs (sjá 10. lið).

Athugun á öðrum fyrirliggjandi upplýsingum (4. þrep).

Á þessu stigi skal meta allar fyrirliggjandi upplýsingar um altæk eiturhrif við íkomuleið um húð. Einnig skal huga að bráðum eiturhrifum prófunaríðefnisins á húð. Ef sýnt hefur verið fram á að prófunaríðefnið sé mjög eitrað við íkomuleið um húð kann að vera óþarfi að prófa það á augum. Þótt ekki sé sjálfgefið að samband ríki milli bráðra eiturhrifa á húð og augnertingar eða augnætingar má gera ráð fyrir því að efni, sem er mjög eitrað við íkomuleið um húð, sýni líka mikil eiturhrif þegar því er dreypt í auga. Þessi gögn má einnig skoða milli 2. og 3. þreps.

Mat á ætandi áhrifum íðefnis á húð ef einnig er gerð krafa um slíkt í eftirlitsskyni (5. þrep).

Fyrst skal meta mátt til húðætingar og mikillar ertingar, í samræmi við prófunaraðferð B.4. (4. heimild) og meðfylgjandi viðbót (8. heimild), þ.m.t. notkun á fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum til að prófa húðætingarmátt í glasi (9.–11. heimild). Ef sýnt hefur verið fram á að íðefnið valdi ætingu eða mikilli húðertingu má einnig líta svo á að það sé ætandi eða mjög ertandi fyrir augun. Þá er ekki þörf á frekari prófunum. Ef íðefnið er hvorki húðætandi né mjög húðertandi skal gera augnprófun í glasi eða utan lífs.

Niðurstöður úr prófunum í glasi eða utan lífs (6. þrep).

Ekki þarf að prófa íðefni á dýrum ef sýnt hefur verið fram á að efnin séu ætandi eða mjög ertandi í prófun í glasi eða utan lífs (12. og 13. heimild) sem hefur verið alþjóðlega fullgilt og viðurkennd sérstaklega fyrir mat á ætingu eða ertingu í augum. Ganga má út frá því að slík íðefni hafi svipuð alvarleg áhrif í lífi. Ef fullgiltar og viðurkenndar prófanir í glasi/utan lífs eru ekki fyrir hendi skal sleppa 6. þrepi og fara beint upp á 7. þrep.

Prófun í lífi á kanínum (7. og 8. þrep).

Hefja skal prófun í lífi á augum með upphafsprófun með einu dýri. Ef niðurstöður úr þessari prófun sýna að íðefnið er mjög augnertandi eða augnætandi skal ekki gera frekari prófanir. Leiði prófunin hvorki í ljós ætandi né mjög ertandi áhrif er gerð staðfestingarprófun með tveimur dýrum til viðbótar. Ef niðurstöður úr staðfestingarprófun gefa tilefni til kann að reynast þörf á frekari prófunum. [sjá prófunaraðferð B.5.]

PRÓFUNAR- OG MATSÁÆTLUN FYRIR AUGNERTINGU/AUGNÆTINGU

	Virkni	Niðurstaða	Niðurstaða
1	Fyrirliggjandi gögn um áhrif á menn og/eða dýr og/eða gögn rannsókna í glasi úr fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum sýna áhrif á augu	Alvarlegar augnskemmdir	Afgerandi endapunktur: skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á prófun.
		Augnertandi	Afgerandi endapunktur: skal teljast augnertandi. Ekki er þörf á prófun.
		Ekki augnætandi/ekki augnertandi	Afgerandi endapunktur: hvorki talið augnætandi né augnertandi. Ekki er krafist prófunar.
	Fyrirliggjandi gögn um áhrif á menn og/eða dýr og/eða gögn rannsókna í glasi úr fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum sýna áhrif á augu	Húðætandi	Gera skal ráð fyrir augnætingareiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	Fyrirliggjandi gögn um áhrif á menn og/eða dýr og/eða gögn rannsókna í glasi úr fullgiltum og alþjóðlega viðurkenndum aðferðum sýna alvarleg, ertandi áhrif á húð	Mjög húðertandi	Gera skal ráð fyrir að efnið sé 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	Vænta má alvarlegra augnskemmda	Gera skal ráð fyrir augnætingareiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
		Vænta má augnertingar	Gera skal ráð fyrir að efnið sé augnertandi. Ekki er þörf á prófun.
	Íhuga skal greiningu á venslum efnabyggingar og virkni m.t.t. húðætingar	Vænta má húðætingareiginleika.	Gera skal ráð fyrir augnætingareiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Ekki er hægt að setja fram spár 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)	Gera skal ráð fyrir augnætingareiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	2 < pH < 11,5 eða pH ≤ 2,0 eða ≥ 11,5 með lítilli eða engri jafnarýmd, ef við á		
	↓		

	Virkni	Niðurstaða	Niðurstaða
4	Íhuga skal fyrirliggjandi gögn um altæk eiturhrif við upptöku í gegnum húð	Mjög eitrað í þeim styrkleikum sem yrðu notaðir við prófun efnis í augum.	Íðefnið er of eitrað fyrir prófun. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Slíkar upplýsingar liggja ekki fyrir eða íðefnið er ekki mjög eitrað		
	↓		
5	Gera skal tilraun til að meta húðætingarmátt samkvæmt prófunaráætluninni í kafla B.4 í þessum viðauka ef einnig er gerð krafa um slíkt í eftirlitsskyni	Ætandi svörun eða mjög ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir að efnið sé augnætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Íðefnið er hvorki húðætandi né mjög húðertandi		
	↓		
6	Framkvæma skal fullgilta og viðurkennda augnætingarprófun eða -prófanir í glasi eða utan lífs	Ætandi svörun eða mjög ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir að íðefnið sé ætandi eða mjög ertandi fyrir augu að því gefnu að hægt sé að nota prófunina sem er framkvæmd til að greina íðefni sem eru augnætandi/mjög augnertandi og íðefnið falli innan notkunarsviðs prófunarinnar. Ekki er þörf á frekari prófun.
		Ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir að íðefnið sé ertandi fyrir augu að því gefnu að hægt sé að nota prófunina eða prófanirnar, sem er(u) framkvæmd(ar), til að sanngreina íðefni sem eru ætandi/mjög ertandi og ertandi og íðefnið falli innan notkunarsviðs prófunarinnar eða prófananna. Ekki er þörf á frekari prófun.
		Engin ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir að íðefnið sé ekki ertandi fyrir augu að því gefnu að hægt sé að nota prófunina eða prófanirnar, sem er(u) framkvæmd(ar), til að sanngreina íðefni sem eru ekki ertandi, aðgreina þau á réttan hátt frá íðefnum sem eru ertandi, mjög ertandi eða ætandi fyrir augu og íðefnið falli innan notkunarsviðs prófunarinnar. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Ekki er hægt að nota fullgilta og viðurkennda prófun eða prófanir í glasi eða utan lífs til að komast að niðurstöðu		
	↓		
7	Framkvæma skal upphafsaugnprófun í lífi með kanínu og skal aðeins nota eitt dýr	Alvarlegar augnskemmdir	Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Engar alvarlegar skemmdir eða engin svörun		
	↓		

	Virkni	Niðurstaða	Niðurstaða
8	Framkvæma skal staðfestingarprófun með einu eða tveimur dýrum til viðbótar	Ertandi eða ætandi	Skal teljast augnætandi eða augnertandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
		Hvorki ætandi né ertandi	Skal hvorki teljast augnertandi né augnætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.

HEIMILDIR:

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. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://www.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://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

4) Kafli B.4 í þessum viðauka, Bráð húðerting/húðæting.

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) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, 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, pp.483 - 524.

7) 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.

8) Viðbót við kafla B.4 í þessum viðauka, Raðprófunaráætlun fyrir húðertingu og húðætingu.

9) Kafli B.40 í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: mæling á rafviðnámi gegnum húð (TER).

10) Kafli B.40a í þessum viðauka, Rannsókn í glasi á húðætingu: prófun með líkani af mannshúð.

11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

12) Kafli B.47 í þessum viðauka, BCOP-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á ógagnsæi og gegndræpi glæru úr nautgrip) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.

13) Kafli B.48 í þessum viðauka, ICE-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á einangruðu auga úr kjúklingi) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða.“

3) Í stað kafla B.10 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.10 **Prófun í glasi á litningabreytingum í spendýrum**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 473 um prófanir (2016). Hún er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Skjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar, sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á þessum viðmiðunarreglunum um prófanir (1. heimild), hefur verið þróað.

Tilgangurinn með prófun í glasi á litningabreytingum er að ganga úr skugga um hvort íðefni valdi byggingarlegum litningabreytingum í ræktuðum spendýrafrumum (2.– 4. heimild). Byggingarlegar breytingar geta verið tvenns konar, annars vegar litningsbreytingar og hins vegar litningsþráðarbreytingar. Fjöllitnun (þ.m.t. innræn tvöföldun) getur komið fyrir í rannsóknum í glasi á litningabreytingum. Þótt mislitnunarvaldandi efni geti valdið fjöllitnun er hún ein og sér ekki til marks um getu þeirra til að valda mislitnun og getur einfaldlega verið til marks um truflun í frumuhring eða frumueiturhrif (5. heimild). Þessi prófun er ekki hönnuð til að mæla mislitnun. Mælt er með smákjarnaprófun í glasi (6. heimild) til að greina mislitnun.

Prófunin í glasi á litningabreytingum fer ýmist fram á ræktum með skilgreindum frumulínum eða ræktum með fyrsta stigs frumum upprunnum í mönnum eða nagdýrum. Frumurnar, sem eru notaðar, skulu valdar eftir vaxtarhæfni þeirra í ræktum, eftir stöðugleika kjarngerðarinnar (þ.m.t. litningafjöldi) og því hve tíðar sjálfsprottnar litningabreytingar eru í þeim (7. heimild). Þau gögn sem nú eru fyrirliggjandi gefa ekki efni til sérstakra tilmæla en gefa til kynna að við mat á hættum af íðefni sé mikilvægt að skoða *p53* ástand, erfðafræðilegan (kjarngerðar) stöðugleika, DNA-viðgerðagetu og uppruna (nagdýr eða maður) frumnanna sem eru valdar í prófunina. Notendur þessarar prófunaraðferðar eru því hvattir til að skoða áhrif þessara og annarra eiginleika frumna á nothæfi frumulínu þegar greind er vakning litningabreytinga, eftir því sem þekking á þessu sviði þróast.

Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun nema frumurnar hafi efnaskiptasvörun við íðefnin sem er verið að prófa. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja í lífi. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem gætu leitt til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga, þ.e. litningaskemmdir sem eru ekki vegna beinna verkana milli prófunaríðefnanna og litninganna; meðal slíkra aðstæðna eru breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk (8.–10. heimild), verkanir milli efnisþátta í miðlinum (11. og 12. heimild) eða of mikil frumueiturhrif (13.–16. heimild).

Þessi prófun er notuð til að greina litningabreytingar sem gætu verið af völdum atburða sem valda litningabrenglun. Greining á vakningu litningabreytinga skal gerð með því að nota frumur í miðfasa. Það er því nauðsynlegt að frumur nái jafnskiptingu, bæði í meðhöndluðum og ómeðhöndluðum ræktum. Sértækar aðlaganir á þessari prófunaraðferð gætu reynst nauðsynlegar vegna tilbúinna nanóefna en þeim er ekki lýst í þessari prófunaraðferð.

Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Frumuræktir, úr mönnum eða öðrum spendýrum, eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar, nema notaðar séu frumur sem hafa fullnægjandi getu til efnaskiptavirkjunar (sjá 13. lið). Frumurnar eru meðhöndlaðar með miðfasastöðvandi efni (t.d. kolsemíði eða kolsisíni) með heppilegu, fyrir fram ákveðnu millibili eftir upphaf váhrifa frá prófunaríðefninu, síðan eru þær heimtar og litaðar og frumur í miðfasa því næst skoðaðar í smásjá í leit að breytingum á litningsþráðum og litningum.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Frumur

Nota má ýmiss konar frumulínur (t.d. úr eggjastokkum kínahamstra (CHO), lunga kínahamstra V79, lunga kínahamstra (CHL)/IU, TK6) eða ræktir fyrsta stigs frumna, þ.m.t. eitilfrumur úr útæðablóði manna eða annarra spendýra (7. heimild). Val á frumulínunum sem eru notaðar skal stutt vísindalegum rökum. Af ástæðum er varða velferð dýra skal nota fyrsta stigs frumur, upprunnar í mönnum, ef það er gerlegt og ef notaðar eru fyrsta stigs frumur, og þær teknar í samræmi við siðferðislegar meginreglur og reglusetningu fyrir menn. Eitilfrumur úr útæðablóði manns skulu fengnar úr ungum einstaklingum (u.þ.b. 18–35 ára) sem reykja ekki og sem ekki er vitað til að séu haldnir sjúkdómum eða hafi nýlega orðið fyrir váhrifum frá efnum sem valda erfðaeiturhrifum (t.d. íðefnum, jónandi geislun) í styrk sem myndi auka bakgrunnstíðni litningabreytinga. Það myndi tryggja að bakgrunnstíðni litningabreytinga yrði lág og jöfn. Grunntíðni litningabreytinga eykst með aldri og sú leitni er meira áberandi hjá konum en körlum (17. og 18. heimild). Ef frumur úr fleiri en einum gjafa eru hópaðar fyrir notkun skal tilgreina fjölda gjafanna. Það er nauðsynlegt að sýna fram á að frumurnar hafi skipt sér frá upphafi meðhöndlunarinnar með prófunaríðefninu að töku þeirra í sýni. Þar eð næmni frumustiganna fyrir prófunaríðefninu er hugsanlega ekki þekkt er frumuræktum haldið í veldisvaxtarfasa (frumulínur) eða þær örvaðar til að skipta sér (fyrsta stigs ræktir eitilfrumna) til að frumurnar verði fyrir váhrifum á mismunandi stigum frumuhringsins. Fyrsta stigs frumur sem þurfa jafnskiptingarörvunarefni til að skipta sér eru alla jafna ekki samstilltar lengur meðan á váhrifunum af prófunaríðefninu stendur (t.d. eitilfrumur úr mönnum eftir 48 klukkustunda örvun jafnskiptingar). Ekki er mælt með að nota samstilltar frumur meðan á meðhöndlun stendur en það er þó ásættanlegt ef það er stutt rökum.

Miðill og ræktunarskilyrði

Til að viðhalda frumuræktum skal nota viðeigandi ræktunarmiðil og aðstæður sem þær eru látnar standa við (ræktunarílát, rakabætt andrúmsloft með 5% CO_2 ef við á, látnar standa við 37 °C hita). Fylgjast skal að staðaldri með frumulínum til að ganga úr skugga um að dæmigerður litningafjöldi sé stöðugur og að ekki sé um berfrymingasmit að ræða (7. og 19. heimild) og ekki skal nota frumur ef þær eru smitaðar eða ef dæmigerður litningafjöldi hefur breyst. Nauðsynlegt er að vita hver er eðlileg lengd frumuhrings frumulína eða fyrsta stigs rækta sem eru notaðar í prófunarstofunni og hún skal vera í samræmi við útgefnu frumueiginleikana (20. heimild).

Undirbúningur ræktа

Frumulínur: frumum úr stofnræktum er fjölgað, sáð í ræktunarmiðil í hæfilegum þéttleika til að frumur í sviflausnum eða einlögum haldi áfram í veldisvexti þar til þær eru heimtar (t.d. ætti að forðast samrennsli frumna sem vaxa í einlögum).

Eitilfrumur: heilblóð, sem er meðhöndlað með segavarnarefni (t.d. heparíni), eða stakar eitilfrumur eru ræktaðar (t.d. 48 stundir ef það eru eitilfrumur úr mönnum) að viðbættum jafnskiptingarræsi, (t.d. fýtóhemaglútíníni (PHA) fyrir eitilfrumur úr mönnum), til að vekja frumuskiptingu áður en kemur að váhrifum frá prófunaríðefninu.

Efnaskiptavirkjun

Nota skal útræn efnaskiptakerfi þegar notaðar eru frumur sem hafa ófullnægjandi getu til útrænna efnaskipta. Kerfið sem algengast er að nota, sem ráðlagt er að nota sem sjálfgefið nema rök séu færð fyrir öðru, er með hvatberasneyddum frumusafa (hér á eftir „S9“), með viðbættum hjálparþætti, sem er unninn úr nagdýralifur (yfirleitt úr rottum) og meðhöndlaður með ensímörvandi efnum, s.s. Aroclor 1254 (21.–23. heimild) eða blöndu fenóbarbítals og β-naptóflavóns (24.–29. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (30. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að vekja oxídasa sem gegna mismunandi hlutverki (24.–27. heimild og 28. heimild). S9-þátturinn er venjulega notaður í styrkleika sem er frá 1 til 2% að rúmmálshlutfalli en má auka upp í 10% rúmmálshlutfall í síðasta prófunarmiðlinum. Meðan á meðhöndlun stendur skal varast notkun vara sem lækka jafnskiptingarhlutfallið, einkum vara með efnum sem mynda kalsíumflóka (31. heimild). Flokkur íðefnanna sem verið er að prófa getur haft áhrif á valið á tegund og styrk útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins eða efnaskiptavakans sem er notaður.

Tilreiðsla prófunaríðefnis

Prófunaríðefni í föstu formi skulu tilreidd í viðeigandi leysum og þynnt, ef við á, áður en frumurnar eru meðhöndlaðar (sjá 23. lið.). Fljótandi prófunaríðefni má setja beint út í prófunarkerfið og/eða þynna þau fyrir meðferðina í prófunarkerfinu. Loftkennd eða rokgjörn prófunaríðefni skulu prófuð með viðeigandi breytingum á stöðluðu aðferðarlýsingunum, s.s. meðhöndlun í innsigluðum ræktunarílátum (32.–34. heimild). Blöndur af prófunaríðefni skulu gerðar rétt fyrir meðhöndlun nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

Prófunarskilyrði

Leysar

Leysirinn skal valinn til að besta leysni prófunaríðefna án þess að hafa neikvæð áhrif á framkvæmd prófunar, t.d. að breyta frumuvexti, hafa áhrif á heilleika prófunaríðefnisins, hvarfast við ræktunarílát, hindra efnaskiptavirkjunarkerfið. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi (eða ræktunarmiðil). Vel þekktir leysar eru t.d. vatn eða dímetýlsúlfoxíð. Almennt skulu lífrænir leysar ekki fara yfir 1% rúmmálshlutfall og vatnskenndir leysar (saltlausn eða vatn) ekki fara yfir 10% rúmmálshlutfall í endanlega meðhöndlunarmiðlinum. Ef notaðir eru aðrir leysar en hinir velþekktu (t.d. etanól eða aseton) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að hægt sé að nota þá með prófunaríðefninu og prófunarkerfinu og að þeir hafi ekki erfðaeiturhrif við styrkinn sem er notaður. Ef þessi gögn til stuðnings liggja ekki fyrir er mikilvægt að hafa ómeðhöndlaðan samanburð með (sjá 1. viðbæti) til að sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, valdi hvorki skaðlegum áhrifum né litningabrenglun.

Mælingar á frumufjölgun og frumueiturhrifum og val á meðhöndlunarstyrk

Þegar hæsti styrkur íðefnis í prófun er ákvarðaður skal forðast styrk sem getur valdið svörun sem er jákvæð vegna gervinga, s.s. styrk sem veldur óhóflegum frumueiturhrifum (sjá 22. lið), útfellingu í ræktunarmiðlinum (sjá 23. lið) eða greinilegum breytingum á sýrustigi eða osmólalstyrk (sjá 5. lið). Ef prófunaríðefni veldur greinilegri breytingu á sýrustigi í miðlinum þegar því er bætt í hann er hægt að stilla sýrustigið með því að jafna endanlega meðhöndlunarmiðilinn þannig að það komi í veg fyrir niðurstöðu sem er jákvæð vegna gervinga og til að viðhalda viðeigandi ræktunarskilyrðum.

Gerðar eru mælingar á frumufjölgun til að tryggja að nægilega margar meðhöndlaðar frumur hafi náð jafnskiptingu meðan á prófuninni stóð og að meðhöndlanirnar fari fram við viðeigandi frumueiturhrif (sjá 18. og 22. lið). Frumueiturhrif skulu ákvörðuð með efnaskiptavirkjun og án hennar í aðaltilrauninni og þar skal styðjast við viðeigandi vísbendingar um frumudauða og frumuvöxt. Ekki er skyldubundið að gera upphafsprófun en þó getur mat á frumueiturhrifum í upphafsprófun verið gagnlegt til að skilgreina betur styrkleikana sem á að nota í aðaltilrauninni. Ef hún er gerð kemur hún ekki í staðinn fyrir mælingarnar á frumueiturhrifum í aðaltilrauninni.

Hlutfallsleg tvöföldun hóps (RPD) eða hlutfallsleg hækkun frumutölu (RICC) eru viðeigandi aðferðir til að meta frumueiturhrif í frumuerfðafræðiprófunum (13., 15., 35., 36. og 55. heimild) (sjá formúlur í 2. viðbæti). Ef um er að ræða langtímameðhöndlun og sýni eru tekin eftir tíma sem er lengri en einn og hálfur eðlilegur frumuhringur (þ.e. lengri en 3 frumuhringir í heildina) frá því að meðhöndlun hefst getur notkun á hlutfallslegri tvöföldun hóps leitt til vanmats á frumueiturhrifum (37. heimild). Við þessar kringumstæður gæti hlutfallsleg hækkun frumutölu verið betri mælikvarði eða mat á frumueiturhrifum eftir eina og hálfa eðlilega lengd frumuhrings verið gagnlegt mat þegar hlutfallsleg tvöföldun hóps er notuð.

Þótt jafnskiptingarhlutfallið sé mælikvarði á frumueiturhrif eða frumuhamlandi áhrif þegar um er að ræða eitilfrumur í fyrsta stigs ræktum verður það fyrir áhrifum af því hversu löngu eftir meðhöndlunina það er mælt, hvaða jafnskiptingarræsir er notaður og mögulegri truflun á frumuhringnum. Jafnskiptingarhlutfallið er á hinn bóginn ásættanlegt af því að það getur verið erfitt og óhentugt að nota annars konar mælingar fyrir frumueiturhrif og þær eiga hugsanlega ekki við um markhóp eitilfrumnanna sem vaxa vegna svörunar við örvun með fýtóhemaglútíníni.

Þótt ráðlagðir mælikvarðar fyrir frumueiturhrif séu hlutfallsleg hækkun frumutölu og hlutfallsleg tvöföldun hóps fyrir frumulínur og jafnskiptingarhlutfall fyrir fyrsta stigs ræktir eitilfrumna geta aðrir vísar (t.d. heilleiki frumna, stýrður frumudauði, drep, frumuhringur) veitt gagnlegar viðbótarupplýsingar.

Meta skal a.m.k. þrjá prófunarstyrkleika (fyrir utan leysinn og jákvæðu samanburðina) sem uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (viðeigandi frumueiturhrif, frumufjölda o.s.frv.). Hver sem gerð frumnanna er (frumulínur eða fyrsta stigs ræktir eitilfrumna) er hægt að nota annað hvort stakar meðhöndlaðar ræktir eða margar samhliða fyrir hvern styrkleika sem er prófaður. Þótt ráðlagt sé að nota tvíteknar ræktir eru stakar ræktir líka ásættanlegar að því tilskildu að talinn heildarfjöldi frumna sé sá sami, bæði í stökum ræktum og tvíteknum ræktum. Það skiptir sérstaklega miklu máli að nota stakar ræktir ef metnir eru fleiri en þrír styrkleikar (sjá 31. lið). Niðurstöður, sem fást úr óháðum samhliða ræktunum við tiltekinn styrkleika, er hægt að hópa fyrir gagnagreininguna (38. heimild). Yfirleitt er hæfilegt að tvö- til þrefalda styrkbilin fyrir prófunaríðefni sem sýna lítil eða engin frumueiturhrif. Ef frumueiturhrif verða skulu prófunarstyrkleikar, sem eru valdir, ná frá sviði sem veldur frumueiturhrifum, eins og lýst er í 22. lið, og yfir styrkleika sem valda miðlungi til lítilla eða engra frumueiturhrifa. Mörg prófunaríðefni sýna brattan feril styrkháðrar svörunar og til að fá gögn yfir lítil og miðlungs eiturhrif, eða til að rannsaka styrkháða svörun ítarlega, er nauðsynlegt að hafa minna bil á milli styrkleika og/eða fleiri en þrjá styrkleika (í stökum ræktum eða samhliða), einkum við skilyrði þar sem endurtekin tilraun er nauðsynleg (sjá 47. lið).

Ef hámarksstyrkurinn grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná 55 ± 5% eiturhrifum með notkun ráðlagðra mælikvarða fyrir frumueiturhrif (þ.e. lækkun hlutfallslegrar hækkunar frumutölu og hlutfallslegrar tvöföldunar hóps fyrir frumulínur og lækkun jafnskiptingarhlutfalls fyrir fyrsta stigs ræktir eitilfrumna í 45 ± 5% af samskeiða neikvæða samanburðinum). Fara skal gætilega við túlkun á jákvæðum niðurstöðum sem koma aðeins fram í hærri enda þessa 55 ± 5% frumueiturhrifasviðs (13. heimild).

Hæsti, greindi styrkleiki torleysanlegra prófunaríðefna, sem hafa ekki frumueiturhrif í styrkleika sem er minni en lægstu leysanleikamörk, á að framkalla grugg eða botnfall sem er greinilegt með berum augum, eða með því að nota umhverfða smásjá, við lok meðhöndlunarinnar með prófunaríðefninu. Þótt frumueiturhrif komi fram í styrkleika sem er hærri en lægstu leysanleikamörk er ráðlagt að prófa við einungis einn styrkleika sem framkallar grugg, eða sýnilegt botnfall, þar eð fellingin getur valdið niðurstöðum sem eru jákvæðar vegna gervinga. Við styrkleikann sem framkallar fellingu skal gætt að því að fellingin trufli ekki framkvæmd prófunarinnar (t.d. litun eða talningu). Það getur verið gagnlegt að ákvarða leysnina í ræktunarmiðlinum fyrir tilraunina.

Ef hvorki koma fram felling né takmarkandi frumueiturhrif skal hæsti prófunarstyrkur samsvara 10 mM, 2 mg/ml eða 2 µl/ml, eftir því hvort er lægra (39.–41. heimild). Ef prófunaríðefnið hefur óskilgreinda samsetningu, t.d. efni með óþekkta eða breytilega samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni (UVCB-efni) (42. heimild), útdráttarefni úr umhverfinu o.s.frv., gæti hæsti styrkleikinn þurft að vera hærri (t.d. 5 mg/ml), ef frumueiturhrifin eru ónóg, til að auka styrk hvers og eins af efnisþáttunum. Þó skal þess getið að þessar kröfur geta verið frábrugðnar fyrir lyf handa mönnum (43. heimild).

Samanburðir

Í hvert sinn sem frumur eru heimtar skal hafa með samskeiða neikvæðan samanburð (sjá 15. lið), sem byggist á því að í meðhöndlunarmiðlinum er eingöngu leysir, sem farið er eins með og meðhöndluðu ræktirnar.

Samskeiða jákvæðir samanburðir eru nauðsynlegir til að sýna fram á getu rannsóknarstofunnar til að greina efni sem veldur litningabrenglun, við þau skilyrði sem tiltekin eru í aðferðarlýsingu prófunarinnar sem er notuð, og skilvirkni útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins, ef það á við. Dæmi um jákvæðan samanburð eru gefin í töflu 1 hér á eftir. Hægt er að nota önnur jákvæð samanburðaríðefni ef það er stutt rökum. Þar eð prófanir í glasi á erfðaeiturhrifum á spendýrafrumur eru nægilega staðlaðar má takmarka notkun jákvæðs samanburðar við efni sem veldur litningabrenglun sem krefst efnaskiptavirkjunar. Þessi eina svörun með jákvæðri samanburðarprófun sýnir fram á bæði virkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og svörunargetu prófunarkerfisins, að því tilskildu að hún sé gerð samskeiða prófuninni sem er án virkjunar og hafi sömu lengd meðhöndlunar. Langtímameðhöndlun (án S9) ætti þó að hafa eigin jákvæðan samanburð þar eð meðhöndlunarlengdin er önnur en í prófuninni þar sem notuð er efnaskiptavirkjun. Í hverjum jákvæðum samanburði skal nota einn eða fleiri styrkleika sem vænst er að valdi samanburðarnákvæmri og greinanlegri aukningu miðað við bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi prófunarkerfisins (þ.e. áhrifin eru greinileg en sýna lesaranum ekki strax auðkenni kóðuðu sýnisglerjanna) og svöruninni skal ekki stefnt í hættu með frumueiturhrifum sem fara yfir mörkin sem eru tilgreind í prófunaraðferðinni.

Tafla 1

Viðmiðunaríðefni sem er mælt með til mats á hæfni rannsóknarstofu og við val á jákvæðum samanburði

Flokkur	Íðefni	CAS-númer
1. Efni sem valda litningabrenglun og eru virk án efnaskiptavirkjunar		
	Metýlmetansúlfónat	66-27-3
	Mítómýsín C	50-07-7
	4-nítrókínólín-N-oxíð	56-57-5
	Sýtósínarabínósíð	147-94-4
2. Efni sem valda litningabrenglun og þarfnast efnaskiptavirkjunar		
	Bensó(a)pýren	50-32-8
	Sýklófosfamíð	50-18-0

VERKFERLI

Meðhöndlun með prófunaríðefni

Frumur, sem eru í fjölgunarferli, eru meðhöndlaðar með prófunaríðefninu, bæði með efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess.

Heimtur úr rækt

Fyrir nákvæmt mat, en það er nauðsynlegt til að ályktа að niðurstaðan sé neikvæð, skulu öll þrenn eftirfarandi tilraunaskilyrði notuð, með stuttri meðhöndlun með og án efnaskiptavirkjunar og langtímameðhöndlun án efnaskiptavirkjunar (sjá 43.–45. lið):

— Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, án efnaskiptavirkjunar, í 3–6 klst. og sýni tekið úr þeim eftir að tími, sem jafngildir einni og hálfri eðlilegri lengd frumuhrings, er liðinn frá upphafi meðhöndlunar (18. heimild).

— Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu með efnaskiptavirkjun í 3–6 klst. og sýni tekið úr þeim eftir að tími, sem jafngildir einni og hálfri lengd eðlilegs frumuhrings, er liðinn frá upphafi meðhöndlunar (18. heimild).

— Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum stanslaust án efnaskiptavirkjunar þar til sýni er tekið úr þeim eftir tíma sem jafngildir einni og hálfri lengd eðlilegs frumuhrings. Sum íðefni greinast frekar (t.d. kirnisleifahliðstæður) ef tíminn fram að meðhöndlun eða sýnatöku er lengri en sem nemur einni og hálfri lengd eðlilegs frumuhrings (24. heimild).

Ef eitthvert af framangreindum tilraunaskilyrðum veldur jákvæðri svörun gæti verið ónauðsynlegt að kanna hin meðhöndlunarkerfin.

Undirbúningur litninga

Frumuræktir eru meðhöndlaðar með kolsemíði eða kolsisíni, venjulega í eina til þrjár klukkustundir, áður en þær eru heimtar. Hver frumurækt er heimt og meðhöndluð sérstaklega þegar kemur að undirbúningi litninga. Undirbúningur á litningum er fólginn í meðhöndlun frumnanna í undirþrýstinni lausn og festingu og litun. Frumur í jafnskiptingu (þekkjast á því að þær eru hringlaga og losa sig frá yfirborðinu) geta verið til staðar í einlögum við lok 3–6 klst. meðhöndlunarinnar. Þar eð þessar frumur í jafnskiptingu losna auðveldlega geta þær glatast þegar miðillinn með prófunaríðefninu er fjarlægður. Ef það eru merki um að fjöldi frumna í jafnskiptingu aukist verulega miðað við samanburðarprófanirnar, sem er vísbending um stöðvaða jafnskiptingu, skal safna frumunum með skiljun og bæta þeim aftur í ræktirnar til að koma í veg fyrir að við heimtur glatist frumur sem eru í jafnskiptingu og hættu á litningabreytingum.

Greining

Öll sýnisgler, þ.m.t. jákvæð og neikvæð samanburðarsýni, skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu á litningabreytingum. Þar eð festingarferlið leiðir oft til þess að hluti frumnanna í miðfasa tapar litningum skal þess gætt að fjöldi þráðhafta í töldum frumum sé algengasta gildi ± 2 fyrir allar frumugerðir.

Fyrir hvern styrkleika og samanburð skal telja a.m.k. 300 frumur sem eru í vel dreifðum miðfasa til að ályktа að prófunaríðefni sé greinilega neikvætt (sjá 45. lið.) Frumurnar 300 skulu skiptast jafnt á milli samhliða ræktа ef þær eru notaðar. Ef notuð er stök rækt fyrir hvern styrkleika (sjá 21. lið) skal telja a.m.k. 300 frumur í vel dreifðum miðfasa í þeirri rækt. Talning á 300 frumum er hagstæðari þar eð hún eykur tölfræðilegan styrk prófunarinnar og auk þess koma núllgildi sjaldan fyrir (aðeins gert ráð fyrir 5% (44. heimild). Fjöldi talinna miðfasa má vera minni ef margar frumur greinast með litningabreytingar og ályktað er að prófunaríðefnið sé greinilega jákvætt.

Telja skal frumur með byggingarlega litningabreytingu eða -breytingar, þ.m.t. með og án skarða. Rof og skörð eru skilgreind í 1. viðbæti í samræmi við 45.–46. heimild. Breytingar í litningsþráðum og litningum skulu skráðar aðskilið og þær flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun). Verkferlin sem notuð eru á rannsóknarstofunni skulu tryggja að greiningar á litningabreytingum séu gerðar af vel þjálfuðu talningafólki og þær jafningjarýndar, ef við á.

Þótt tilgangur prófunarinnar sé að greina byggingarlegar breytingar í litningum er mikilvægt að skrá tíðni fjöllitnunar og innrænnar tvöföldunar þegar slíkra breytinga verður vart (sjá 2. lið).

Hæfni rannsóknarstofunnar

Rannsóknarstofan skal framkvæma röð tilrauna á verkan jákvæðra viðmiðunaríðefna, í mismunandi gangvirki, og mismunandi neikvæðum samanburðarefnum (með notkun á mismunandi leysum/burðarefnum) til að staðfesta að nægileg reynsla sé af prófuninni áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Svaranirnar í þeim jákvæða og neikvæða samanburði skulu vera í samræmi við heimildir. Þetta á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltæka grunna með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 37. lið.

Kanna skal nokkur valin, jákvæð samanburðaríðefni (sjá töflu 1 í 26. lið) í stuttum og löngum meðhöndlunum án efnaskiptavirkjunar, og einnig í stuttri meðhöndlun með efnaskiptavirkjun, til að sýna fram á hæfni við greiningu á litningabrenglandi íðefnum og ákvarða skilvirkni efnaskiptavirkjunarkerfisins. Velja skal styrksvið völdu íðefnanna þannig að það fáist samanburðarnákvæmar og styrktengdar aukningar sem eru hærri en bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

Rannsóknarstofan skal ákvarða:

— svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu,

— svið og dreifingu neikvæðs samanburðar (ómeðhöndlað, leysir) samkvæmt rannsóknarsögu.

Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt viðmiðunargögn, ef þau liggja fyrir. Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um dreifingu samanburðarins skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka (e. *control limits*) þeirrar samanburðadreifingar (44. og 47. heimild). Rannsóknarsögulegur gagnagrunnur rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð ætti í upphafi að byggjast á 10 tilraunum að lágmarki en æskilegra væri að hann samanstæði af a.m.k. 20 tilraunum sem eru gerðar við sambærileg tilraunaskilyrði. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „*C-charts*, *X-bar charts*“ (48. heimild)) til að greina hversu breytileg viðmiðunargögn þeirra um jákvæða og neikvæða samanburði eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi (44. heimild). Frekari ráðleggingar um uppbyggingu rannsóknarsögulegra gagna og notkun þeirra (þ.e. viðmiðanir fyrir hvaða gögn eru höfð með og hver ekki í rannsóknarsögunni og ásættanleikaviðmiðanir fyrir tiltekna tilraun) er að finna í 47. heimild.

Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til samræmis þeirra við fyrirliggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Allt verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði.

Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af tíðni frumna með litningabreytingar úr stakri rækt eða summu samhliða ræktana, eins og lýst er í 21. lið. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (44. og 47. heimild). Ef gögn um samskeiða neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka fyrir samanburði getur þó verið ásættanlegt að hafa þau með í rannsóknasögulegri samanburðardreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfarar og að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá 37. lið) og að ekki sé um tæknileg eða mannleg mistök að ræða.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Framsetning niðurstaðna

Meta skal hundraðshluta frumna með eina eða fleiri byggingarlega litningabreytingu. Breytingar í litningsþráðum og litningum sem eru flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun) skulu skráðar aðskilið, með fjölda þeirra og tíðni, fyrir tilrauna- og samanburðarræktir. Skrá skal skörð og greina frá þeim aðskilið en þau skulu ekki höfð með í heildartíðni breytinga. Ef fjöllitnun og/eða innræn tvöföldun í frumum kemur fram er greint frá hlutfallinu.

Í aðaltilraununum, sem varða litningabreytingar, skal skrá allar samskeiða mælingar á frumueiturhrifum fyrir allar meðhöndlaðar, neikvæðar og jákvæðar samanburðarræktir.

Skrá skal gögn um hverja rækt fyrir sig. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Samþykki fyrir prófun byggist á eftirfarandi viðmiðunum:

— Samskeiða neikvæði samanburðurinn er talinn ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð, eins og lýst er í 39. lið.

— Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 26. lið) skulu vekja svaranir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum um jákvæðan samanburð og valda tölfræðilega marktækri aukningu miðað við samskeiða neikvæða samanburðinn.

— Farið skal að viðmiðunum um frumufjölgun í samanburðinum með leysinum (17. og 18. liður).

— Öll þrenn tilraunaskilyrðin voru prófuð nema eitt þeirra hafi gefið jákvæðar niðurstöður (sjá 28. lið).

— Nægilegur fjöldi frumna og styrkleika er greinanlegur (31. og 21. liður).

— Viðmiðunin fyrir valinu á hæsta styrkleika er í samræmi við það sem lýst er í 22.–24. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 28. lið), ef:

a) að minnsta kosti einn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) aukningin er skammtatengd í mati með viðeigandi leitniprófun,

c) einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 39. lið).

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið litningabreytingar í ræktuðum spendýrafrumum í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má finna í 49.–51. heimild.

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 28. lið), ef:

a) enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) það er engin skammtatengd aukning í mati með viðeigandi leitniprófun,

c) allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 39. lið).

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið litningabreytingar í ræktuðum spendýrafrumum í þessu prófunarkerfi.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

Ef svörunin er hvorki greinilega neikvæð né greinilega jákvæð, eins og lýst er hér á undan, eða til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu, skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar. Það getur verið gagnlegt að telja viðbótarfrumur (eftir því sem við á) eða gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota breytt tilraunaskilyrði (t.d. styrkleikabil, önnur skilyrði við efnaskiptavirkjun (þ.e. styrk eða uppruna S9)).

Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að svörun prófunaríðefnisins sé tvíræð.

Ef fjöllitna frumum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunaríðefnið geti hamlað jafnskiptingarferlum og stuðlað að breytingum á litningafjölda (52. heimild). Ef frumum með innræna tvöföldun í litningum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunaríðefnin geti stöðvað framrás frumuhringsins (53. og 54. heimild) (sjá 2. lið). Því skal tíðni fjöllitna frumna og frumna með innræna tvöföldun skráð aðskilið.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni:

— uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir.

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur.

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum, ef þekkt,

— mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarmiðlinum sem prófunaríðefninu var bætt í, eins og við á.

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Leysir:

— rök fyrir vali á leysi.

— Einnig skal gefa upp hundraðshluta leysis í lokaræktunarmiðlinum.

Frumur:

— gerð og uppruni frumna,

— einkenni kjarngerðarinnar og hæfi þeirrar frumugerðar sem er notuð,

— upplýsingar um að frumulínur séu ekki smitaðar berfrymingum,

— upplýsingar um lengd frumuhrings, tvöföldunartíma eða fjölgunarstuðul frumulína,

— kyn blóðgjafa, aldur og allar upplýsingar um gjafann sem skipta máli, heilblóð eða einangraðar eitilfrumur, jafnskiptingarræsirinn sem er notaður,

— umsáningartala frumulína, ef við á,

— aðferðir til að viðhalda frumuræktum frumulína,

— eðlilegur fjöldi litninga í frumulínum.

Prófunarskilyrði:

— auðkenni miðfasastöðvandi íðefnis, styrkur þess og hversu lengi frumur eru látnar verða fyrir váhrifum frá því,

— styrkleiki prófunaríðefnisins, gefinn upp sem lokastyrkur í ræktunarmiðlinum (t.d. í μg eða mg/ml eða mM af ræktunarmiðli),

— rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda ræktа sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni,

— samsetning ræktunarmiðils, styrkur CO2, ef við á, rakastig,

— styrkleiki (og/eða rúmmál) leysis og prófunaríðefnis sem er bætt í ræktunarmiðilinn,

— ræktunarhiti,

— ræktunartími,

— lengd meðhöndlunar,

— hvenær frumur eru heimtar eftir meðhöndlun,

— frumuþéttleiki við sáningu, ef við á,

— gerð og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfisins (uppruni S9, tilreiðsluaðferð S9-blöndunnar, styrkleiki eða rúmmál S9-blöndunnar og S9 í lokaræktunarmiðlinum, gæðaeftirlit með S9),

— jákvæð og neikvæð samanburðaríðefni, lokastyrkleiki við öll meðhöndlunarskilyrði,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja og tæknin sem er notuð við litun,

— viðmiðanir fyrir ásættanleika greininga,

— viðmiðanir fyrir talningu breytinga,

— fjöldi frumna í miðfasa sem greinast,

— aðferðir við mælingar á frumueiturhrifum,

— allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif og aðferðina sem er notuð,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar,

— aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða sýrustig, osmólalstyrk og útfellingu.

Niðurstöður:

— fjöldi meðhöndlaðra frumna og fjöldi heimtra frumna fyrir hverja rækt þegar frumulínur eru notaðar,

— mælingar á frumueiturhrifum, t.d. hlutfallsleg tvöföldun hóps, hlutfallsleg hækkun frumutölu, jafnskiptingarhlutfall, aðrar athuganir ef þær eru gerðar,

— upplýsingar um lengd frumuhrings, tvöföldunartíma eða fjölgunarstuðul ef um frumulínur er að ræða,

— merki um útfellingu og hvenær hún er ákvörðuð,

— skilgreining á breytingum, m.a. á skörðum,

— fjöldi talinna frumna, fjöldi frumna með litningabreytingum og tegundir litningabreytinga tilgreindar aðskilið fyrir hverja meðhöndlaða rækt og samanburðarrækt, með og án skarða,

— breytingar á litnun ef hún sést (fjöllitna frumur og frumur með innræna tvöföldun gefnar upp aðskilið),

— tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar),

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfráviki og 95% stýrimörkum dreifingar, sem og fjöldi gagna,

— tölfræðilegar greiningar, p-gildi ef þau liggja fyrir.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Ályktanir.

HEIMILDIR:

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), "The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), "Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) Kafli B.49 í þessum viðauka: *Smákjarnaprófun í glasi á spendýrafrumum***.**

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation* Research*/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(11) Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. et al. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. et al. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. et al. (1998), Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. et al. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, Human Genetics, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. et al. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, Mutation Research, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. et al. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. et al. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, Mutagenesis, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. et al. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, Mutation Research, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix in vitro, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

(27) Matsushima, T. et al. (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J. et al. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. et al. (1994). Report from Working Group on in vitro Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stokkhólmssamningur um þrávirk lífræn efni, Umhverfisstofnun Sameinuðu þjóðanna. Aðgengilegur á: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, Mutation Research, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

(38) Richardson, C. et al. (1989), Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the in vitro mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Aðgengilegt samkvæmt beiðni.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, Mutation Research/Genetic *Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Aðgengilegt á: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)", Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. et al. (1990), "Metaphase chromosome aberration assays in vitro", in Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, Mutation Research, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), Sta*tistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. et al. (1989), "Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, Mutation Research, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Research, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Research, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.'

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Mislitnun: öll frávik frá eðlilegum fjölda tvílitna (eða einlitna) litninga sem nema einum eða fleiri litningum en ekki ef um er að ræða heilt sett eða heil sett litninga (fjöllitnun).

Stýrður frumudauði: frumudauði sem er stýrt og einkennist af röð þrepa sem leiða til sundrunar frumna í agnir sem bindast himnunni og er síðan eytt með agnaáti eða með losun.

Frumufjölgun: aukning á frumufjölda vegna jafnskiptingar frumna.

Íðefni: efni eða blanda.

Rof í litningsþræði: ósamfella í einstökum litningsþræði þannig að uppröðun eins litningsþráðanna hefur greinilega breyst.

Skarð í litningsþræði: ólitað svæði (litlaus skemmd) í einstökum litningsþræði þannig að uppröðun litningsþráðanna er nálægt því að vera eðlileg.

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að einstakir litningsþræðir rofna eða rofna og tengjast síðan aftur öðrum þráðum.

Litningabreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að báðir litningsþræðirnir rofna á sama stað eða rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Efni sem veldur litningabrenglun: öll íðefni sem valda byggingarlegum litningabreytingum í frumuhópum eða heilkjarnalífverum.

Styrkleikar: vísar til lokastyrkleika prófunaríðefnisins í ræktunarmiðlinum.

Frumueiturhrif: að því er varðar rannsóknir með notkun á frumulínum sem þessi prófunaraðferð nær yfir eru frumueiturhrif greind sem minnkun á hlutfallslegri tvöföldun hóps (RPD) eða hlutfallslegri hækkun frumutölu (RICC) hjá meðhöndluðu frumunum borið saman við neikvæða samanburðinn (sjá 17. lið og 2. viðbæti). Að því er varðar rannsóknir með notkun á fyrsta stigs ræktum eitilfrumna sem þessi prófunaraðferð nær yfir eru frumueiturhrif greind sem lækkun jafnskiptingarhlutfalls (MI) í meðhöndluðu frumunum borið saman við neikvæða samanburðinn (sjá 18. lið og 2. viðbæti).

Innræn tvöföldun: ferli þar sem kjarninn gengur ekki inn í jafnskiptingarferlið eftir S-fasa DNA-eftirmyndunar heldur byrjar annan S-fasa. Út úr þessu koma litningar með 4, 8, 16..., litningsþráðum.

Erfðaeiturhrif: almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. rof, úrfelling, viðbætur, breytingar á núkleótíðum og tengingar þeirra, endurröðun, genastökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

Jafnskiptingarhlutfall (MI): hlutfallið milli fjölda frumna í miðfasa og mælds heildarfjölda frumna í frumuhópi; vísbending um hve ör fjölgunin er í þessu frumuhópi.

Jafnskipting: skipting frumukjarnans sem skiptist oftast í forfasa, formiðfasa, miðfasa, síðfasa og lokafasa.

Stökkbreytandi: veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

Breyting á fjölda: breyting á fjölda litninga frá því sem eðlilegt er í þeim frumum sem eru notaðar.

Fjöllitnun: breytingar á litningafjölda í heilu setti eða settum litninga í frumum eða lífverum í stað staks litnings eða stakra litninga (mislitnun).

p53 ástand: prótín p53 hefur hlutverk í stillingu frumuhrings, stýrðum frumudauða og DNA-viðgerð. Frumum, sem skortir virkt p53 prótín og geta ekki stöðvað frumuhring eða losað skemmdar frumur með stýrðum frumudauða eða öðru gangvirki (t.d. vakningu DNA-viðgerðar), sem tengist virkni p53 sem viðbragð við DNA-skemmd, ætti fræðilega séð að vera hættara við genastökkbreytingum eða litningabreytingum.

Hlutfallsleg hækkun frumutölu (RICC): aukning á frumufjölda í ræktum sem hafa orðið fyrir váhrifum af íðefnum á móti aukningu í ómeðhöndluðum ræktum, hlutfall sem er gefið upp í hundraðshlutum.

Hlutfallsleg tvöföldun hóps: fjölgun hópa sem tvöfaldast í ræktum sem hafa orðið fyrir váhrifum af íðefnum á móti fjölgun í ómeðhöndluðum ræktum, hlutfall sem er gefið upp í hundraðshlutum.

S9-lifrarþáttur: flot af lifrarjafningi eftir skiljun við 9000 g, þ.e. útdráttur úr hrárri lifur.

S9-blanda: blanda af S9-lifrarþættinum og hjálparþáttunum sem eru nauðsynlegir fyrir virkni efnaskiptaensíma.

Samanburður með leysi: almennt hugtak til útskýringar á samanburðarræktum sem í er eingöngu settur leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnið.

Byggingarleg breyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun í miðfasa frumuskiptingar sem úrfelling og bútar, breytingar innan litninga eða milli litninga.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Ómeðhöndlaður samanburður: ræktir sem eru ekkert meðhöndlaðar (þ.e. hvorki með prófunaríðefni né leysi) en eru unnar samtímis og á sama hátt og ræktirnar sem prófunaríðefnið er sett í.

———

2. viðbætir

FORMÚLUR FYRIR MAT Á FRUMUEITURHRIFUM

Jafnskiptingarhlutfall (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Fjöldi frumna í jafnskiptingu}}{\text{Heildarfjöldi talinna frumna}} \times 100$$

Mælt er með að nota hlutfallslega hækkun frumutölu (RICC) eða **hlutfallslega tvöföldun hóps (RPD)** þar eð báðar mælingarnar taka tillit til þess hlutfalls frumuhópsins sem hefur skipt sér.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aukinn fjöldi frumna í meðhöndluðum ræktum(við lok– við upphaf)})}{\left(\text{Aukinn fjöldi frumna í samanburðarrækum(við lok– við upphaf)}\right)} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{fjöldi hópa sem tvöfaldast í meðhöndluðum ræktum})}{(\text{fjöldi hópa sem tvöfaldast í samanburðarræktum})} \times 100$$

Þar sem:

tvöföldun hópa = [log (frumufjöldi eftir meðhöndlun ÷ upphaflegur frumufjöldi)] ÷ log 2

Til dæmis bendir 53% hlutfallsleg hækkun frumutölu eða hlutfallsleg tvöföldun hóps til 47% frumueiturhrifa/frumuhamningar og 55% frumueiturhrif/frumuhamning mæld með jafnskiptingarhlutfalli merkir að raunverulegt jafnskiptingarhlutfall er 45% af samanburðinum.

Í öllu falli ætti að mæla frumufjölda áður en meðhöndlun hefst og einnig í meðhöndluðum og neikvæðum samanburðarræktum.

Ekki er lengur mælt með að nota fjölda frumna í meðhöndluðum ræktum/fjölda frumna í samanburðarræktum (RCC) sem mæliþátt fyrir frumueiturhrif, þótt það hafi áður verið gert, af því hann getur vanmetið frumueiturhrif.

Tvöföldun hóps í neikvæðum samanburðarræktum skal vera í samræmi við kröfurnar um að taka frumusýni eftir meðhöndlun þegar liðinn er tími sem jafngildir einni og hálfri lengd eðlilegs frumuhrings og jafnskiptingarhlutfall ætti að vera nógu hátt til að fá nægilega margar frumur í jafnskiptingu og fyrir áreiðanlega útreikninga á 50% minnkun.

4) Í stað kafla B.11 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.11 **Prófun á litningabreytingum í beinmerg spendýra**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 475 um prófanir (2016). Hún er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Skjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar, sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á þessum viðmiðunarreglunum um prófanir (1. heimild), hefur verið þróað.

Prófun í lífi á litningabreytingum í beinmerg spendýra hentar einkum til að meta hættu á erfðaeiturhrifum þar sem þættir í efnaskiptum, lyfjahvörfum og viðgerðarferli DNA eru virk í lífi og stuðla að svörun, þótt þessir þættir séu hugsanlega breytilegir eftir dýrategundum. Prófun í lífi er einnig gagnleg til frekari rannsóknar á erfðaeiturhrifum sem koma fram við prófun í glasi.

Prófun í lífi á litningabreytingum í spendýrafrumum er notuð til að greina byggingarlegar litningabreytingar sem prófunaríðefnin kalla fram í beinmergsfrumum hjá dýrum, yfirleitt nagdýrum (2.–5. heimild). Byggingarlegar litningabreytingar geta verið tvenns konar, annars vegar litningabreytingar og hins vegar litningsþráðarbreytingar. Þótt þorri erfðaeiturhrifabreytinga sem íðefni kalla fram séu litningsþráðarbreytingar sjást litningabreytingar líka. Litningaskemmdir og tengdir atburðir eru orsök margra erfðasjúkdóma í mönnum og haldgóðar vísbendingar eru um að þegar þessar skemmdir og tengdir atburðir valda breytingum á æxlisgenum og æxlisbælandi genum í líkamsfrumum þá komi þau við sögu við myndun krabbameins í mönnum og tilraunadýrum. Fjöllitnun (þ.m.t. innræn tvöföldun) getur komið fyrir í rannsóknum í lífi á litningabreytingum. Aukin fjöllitnun sem slík er þó ekki til marks um getu til að valda mislitnun og getur einfaldlega verið til marks um truflun í frumuhring eða frumueiturhrif. Þessi prófun er ekki hönnuð til að mæla mislitnun. Mælt er með prófun í lífi á smákjörnum rauðkorna hjá spendýrum (kafli B.12 í þessum viðauka) eða smákjarnaprófun í glasi á spendýrafrumum (kafli B.49 í þessum viðauka), sem prófununum í lífi og í glasi, eftir því sem við á, til að greina mislitnun.

Skilgreiningar á íðorðanotkun eru settar fram í 1. viðbæti.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

Nagdýr eru venjulega notuð til þessarar prófunar en í sumum tilvikum gæti átt við að nota aðrar tegundir ef fyrir því eru vísindaleg rök. Markvefurinn í þessari prófun er beinmergur þar eð hann er mjög æðaríkur vefur og í honum eru frumur sem fjölga sér ört og auðvelt er að einangra þær og meðhöndla. Vísindaleg rök fyrir notkun á öðrum tegundum en rottum og músum skulu sett fram í skýrslunni. Ef aðrar tegundir en nagdýr eru notuð er mælt með því að mæling á litningabreytingum í beinmerg verði felld inn í aðra viðeigandi eiturhrifaprófun.

Þessi prófun hentar e.t.v. ekki ef sannanir eru fyrir því að prófunaríðefnið eða -íðefnin, eða hvarfgjarnt/hvarfgjörn umbrotsefni þess, nái ekki út í markvefinn.

Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og eru síðan aflífuð á mannúðlegan hátt þegar meðferðin hefur staðið hæfilega lengi. Dýrin eru meðhöndluð fyrir aflífun með metafasastöðvandi efni (t.d. kolsisíni eða kolsemíði). Litningasýni eru því næst útbúin úr beinmergsfrumum og lituð og frumur í miðfasa eru síðan greindar m.t.t. litningabreytinga.

SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

Hæfnirannsóknir

Rannsóknarstofan skal hafa sýnt fram á getu til að endurtaka þær niðurstöður sem reiknað er með út frá útgefnum gögnum (t.d. 6. heimild) um tíðni litningabreytinga með að lágmarki tveimur jákvæðum samanburðaríðefnum (þ.m.t. veikar svaranir af völdum lítilla skammta af jákvæða samanburðinum), s.s. þeim sem eru talin upp í töflu 1 og með samrýmanlegum samanburði með burðarefni eða leysi (sjá 22. lið) til að staðfesta að nægileg reynsla sé af framkvæmd greiningarinnar áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Í þessum tilraunum skal nota skammta sem valda samanburðarnákvæmri og skammtatengdri aukningu og sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins í vefnum sem verið er að rannsaka (beinmerg) og nota skal talningaraðferðina sem notuð verður á rannsóknarstofunni. Þessi krafa á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltæka grunna með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 10.–14. lið.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

Meðan á hæfnirannsóknunum stendur skal rannsóknarstofan ákvarða:

— svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu, og

— svið og dreifingu neikvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu.

Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt viðmiðunargögn, ef þau liggja fyrir. Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um rannsóknarsögulega samanburðardreifingu skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka þeirrar samanburðadreifingar. Rannsóknarsögulegur gagnagrunnur rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð skal vera tölfræðilega sterkur til að tryggja getu rannsóknarstofunnar til að meta dreifingu gagna sinna um neikvæðan samanburð. Í heimildum er lagt til að e.t.v. þurfi a.m.k.10 tilraunir en æskilegra væri að hann samanstæði af a.m.k. 20 tilraunum sem eru gerðar við sambærileg tilraunaskilyrði. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „*C-charts, X-bar charts"* (7. heimild)) til að greina hversu breytileg gögn þeirra eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi. Frekari ráðleggingar um uppbyggingu rannsóknarsögulegra gagna og notkun þeirra (þ.e. viðmiðanir fyrir hvaða gögn eru höfð með og hver ekki í rannsóknarsögunni og ásættanleikaviðmiðanir fyrir tiltekna tilraun) er að finna í 8. heimild.

Ef rannsóknarstofan lýkur ekki við nægilegan fjölda tilrauna til að staðfesta tölfræðilega sterka dreifingu neikvæða samanburðarins (sjá 11. lið) meðan á hæfnirannsóknum stendur (sem lýst er í 9. lið), er ásættanlegt að byggja upp dreifinguna meðan á fyrstu venjubundnu prófununum stendur. Þessi aðferð skal fylgja tilmælunum sem sett eru fram í 8. heimild og niðurstöður fyrir neikvæðan samanburð, sem fást úr þessum tilraunum, skulu vera áfram í samræmi við birt neikvæð viðmiðunargögn.

Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til áhrifa þeirra á niðurstöður þannig að þær séu í samræmi við fyrirliggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Einungis verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði ef sérfræðingar ákvarða að hann sé ólíkur fyrri dreifingu (sjá 11. lið). Meðan honum er komið á aftur er e.t.v. ekki þörf á fullkomnum gagnagrunni um neikvæða samanburði til að unnt sé að framkvæma raunverulega prófun, að því tilskildu að rannsóknarstofan geti sýnt fram á að samhliða neikvæð samanburðargildi þeirra séu annað hvort í samræmi við fyrri gagnagrunn þeirra eða samsvarandi birt gögn.

Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af tíðni byggingarlegra litningabreytinga (án skarða) í hverju dýri. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði. Ef gögn um samskeiða neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka fyrir samanburði getur þó verið ásættanlegt að hafa þau með í rannsóknasögulegri samanburðardreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfarar og að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá 11. lið) og engin merki um tæknileg eða mannleg mistök.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Val á dýrategund

Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Algengt er að nota rottur en einnig getur átt við að nota mýs. Heimilt er að nota aðrar heppilegar tegundir spendýra ef sett eru fram vísindaleg rök í skýrslunni.

Aðbúnaður dýra og fóðrun

Að því er varðar rottur skal hiti í vistarverum dýranna vera 22 °C (±3 ºC). Þótt æskilegt rakastig sé 50–60%, skal það að minnsta kosti vera 40% og helst ekki fara yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunaríðefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Nagdýr skulu vera í búri í litlum hópum (ekki fleiri en fimm saman) af sama kyni og sama meðferðarhóp ef árásargirni er ekki vænst, helst í búrum með gegnheilu gólfi með viðeigandi umhverfisfjölbreytni. Dýr mega aðeins vera hvert í sínu búri ef fyrir því eru vísindaleg rök.

Undirbúningur dýranna

Að jafnaði eru notuð ung, heilbrigð, fullvaxin dýr (að því er varðar nagdýr, helst 6–10 vikna gömul við upphaf meðferðar þótt dálítið eldri dýr séu einnig ásættanleg) og þeim slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Hvert dýr skal auðkennt sérstaklega með mannúðlegri aðferð með lágmarks inngripi (t.d. með merkingu með hring, ífestu spjaldi, örflögu eða lífkenni, en ekki mörkun eyrna og afklippingu táa) og það látið laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Forðast skal víxlmengun af völdum jákvæða samanburðarins og prófunaríðefnisins. Við upphaf rannsóknarinnar skal breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

Tilreiðsla skammta

Prófunaríðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með viðeigandi leysum eða burðarefnum eða blandað í fóður eða drykkjarvatn áður en þau eru skömmtuð dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunaríðefni óblönduð eða þynnt fyrir skammtagjöf. Ef greina á váhrif við innöndun má gefa prófunaríðefni sem gas, gufu eða sem fast/fljótandi úðaefni, allt eftir eðlisefnafræðilegum eiginleikum þeirra. Nota skal ferskar blöndur af prófunaríðefninu nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu og tiltaki viðeigandi geymsluskilyrði.

Leysir/burðarefni

Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunaríðefnin. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Dæmi um algengan samrýmanlegan leysi/burðarefni er vatn, lífeðlisfræðileg saltlausn, metýlsellulósalausn, saltlausn úr natríumkarboxýmetýlsellulósa, ólífuolía og maísolía. Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg gögn eða útgefin samanburðargögn sem sýna að ódæmigerði leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki byggingarlegar litningabreytingar eða önnur skaðleg áhrif skal gera upphafsrannsókn til að byggja upp ásættanleika fyrir leysis-/burðarefnissamanburðinn.

Samanburðir

Jákvæðir samanburðir

Að jafnaði skal hafa hóp dýra í hverri prófun sem er meðhöndlaður með jákvæðu samanburðaríðefni. Heimilt er að falla frá þessu þegar prófunarstofa hefur sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunarinnar og hefur ákvarðað svið jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu. Ef samskeiða jákvæður samanburðarhópur er ekki hafður með skal vera talningarsamanburður (sýnisgler með festum og ólituðum sýnum) í hverri tilraun. Þessu er hægt að ná fram með því að hafa með í talningu rannsóknarinnar viðeigandi viðmiðunarsýni, sem hafa verið tekin og geymd, úr aðskilinni tilraun með jákvæðum samanburði sem fer reglulega fram (t.d. á 6–18 mánaða fresti) á rannsóknarstofunni þar sem prófunin er gerð, t.d. meðan á hæfnisprófun stendur og reglulega eftir það, ef nauðsyn krefur.

Jákvæð samanburðaríðefni skulu framkalla með áreiðanlegum hætti greinanlega aukningu á frumum með byggingarlegar litningabreytingar umfram magn sjálfsprottinna breytinga. Velja skal skammtastærðir fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að talningafólk geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnin. Það er ásættanlegt að íkomuleið fyrir jákvæða samanburðinn sé önnur en sú sem er notuð fyrir prófunaríðefnið, með notkun á ólíkum meðferðaráætlunum, og að sýnataka sé aðeins í eitt skipti. Auk þess má kanna hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, eftir því sem við á. Dæmi um jákvæð samanburðaríðefni er að finna í töflu 1.

Tafla 1

Dæmi um jákvæð samanburðaríðefni

Íðefni	CAS-númer
Etýlmetansúlfónat	62-50-0
Metýlmetansúlfónat	66-27-3
Etýlnítrósóúrea	759-73-9
Mítómýsín C	50-07-7
Sýklófosfamíð(mónóhýdrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Tríetýlenmelamín	51-18-3

Neikvæðir samanburðir

Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með neikvæðan samanburðarhóp dýra sem er meðhöndlaður á sama hátt og meðferðarhóparnir að öðru leyti en því að hann fær ekki prófunaríðefnið. Ef leysir/burðarefni er notað við inngjöf prófunaríðefnisins skal gefa samanburðarhópnum þann leysi/burðarefni. Hins vegar, ef sýnt hefur verið fram á samræmi í breytileika milli dýra og tíðni frumna með byggingarlegar litningabreytingar með rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæðan samanburð á hverjum sýnatökutíma fyrir prófunarstofuna, er e.t.v. einungis þörf á einni sýnatöku fyrir neikvæða samanburðinn. Ef ein sýnataka er notuð fyrir neikvæða samanburði skal það vera fyrsti sýnatökutíminn í rannsókninni.

VERKFERLI

Fjöldi og kyn dýra

Alla jafna er smákjarnasvörunin svipuð hjá karl- og kvendýrum (9. heimild) og þess er vænst að þetta eigi einnig við um byggingarlegar litningabreytingar; því má gera flestar rannsóknir á hvoru kyni sem er. Gögn sem sýna fram á mismun sem máli skiptir á milli karl- og kvendýra (t.d. mismun á altækum eiturhrifum, efnaskiptum, lífaðgengi, eiturhrifum í beinmerg o.s.frv., þ.m.t. er t.d. skammtastærðarannsókn) myndu styðja notkun beggja kynja. Í því tilviki getur verið rétt að gera rannsókn á báðum kynjum, t.d. sem hluta af rannsókn á eiturhrifum við endurtekna skammta. Það gæti verið rétt að nota þáttbundna tilhögun ef bæði kynin eru notuð. Upplýsingar um hvernig á að greina gögnin með notkun þessarar tilhögunar er að finna í 2. viðbæti.

Hópastærðir við upphaf rannsóknarinnar skulu ákvarðaðar með það fyrir augum að með þeim fáist a.m.k. 5 greiningarbær dýr af öðru kyninu, eða af hvoru kyni ef bæði er notuð, á hvern hóp. Ef váhrif á menn frá íðefnum eru hugsanlega kynbundin, eins og raunin er með sum lyfjaefni, skal prófunin fara fram á því kyni sem við á hverju sinni. Til leiðbeiningar varðandi dæmigerðan hámarksfjölda dýra myndi rannsókn á beinmerg á tveimur sýnatökutímum með þremur skammtahópum og samskeiða neikvæðum og jákvæðum samanburðarhóp (hver hópur samanstendur af fimm dýrum af sama kyninu), útheimta 45 dýr.

Skammtastærðir

Ef engin nothæf gögn liggja þegar fyrir, sem gagnast við val á skömmtum, og skammtastærðarannsókn er framkvæmd skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni og kyni tilraunadýrs og eru notuð í meginrannsókninni (10. heimild). Markmið rannsóknarinnar skal vera að greina hámarksþolsskammt, sem er skilgreindur sem hæsti þolanlegi skammtur án vísbendinga um rannsóknartakmarkandi eiturhrif, í hlutfalli við lengd rannsóknartímabilsins (framkallar t.d. þyngdartap eða frumueiturhrif í blóðfrumnamyndandi kerfi (e. *hematopoietic system cytotoxicity*)), en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun á mannúðlegan hátt nauðsynlega (11. heimild).

Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturhrif í beinmerg.

Íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, eða vekja afeitrunarferla sem geta leitt til minnkunar á váhrifum eftir langtímainngjöf, geta verið undantekningar frá viðmiðunum um skammtaákvörðun og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig.

Til að fá fram upplýsingar um skammtasvörun skal í heildstæðri rannsókn taka með neikvæðan samanburðarhóp og minnst þrjár skammtastærðir sem eru almennt aðskildar með stuðli sem nemur 2 en ekki meira en 4. Ef prófunaríðefnið framkallar ekki eiturhrif í skammtastærðarannsókn eða byggt á fyrirliggjandi gögnum skal hæsti skammtur fyrir eina inngjöf vera 2000 mg/kg líkamsþyngdar. Ef prófunaríðefnið veldur eiturhrifum skal hámarksþolsskammtur þó vera hæsti skammtur sem er gefinn og skammtastærðirnar sem eru notaðar skulu helst spanna bilið frá mestu eiturhrifum niður í skammt sem framkallar lítil eða engin eiturhrif. Ef eiturhrif í markvefjum (beinmerg) koma fram við allar skammtastærðirnar sem eru prófaðar er ráðlagt að gera frekari rannsóknir á skömmtum sem eru ekki eitraðir. Í rannsóknum, sem eru ætlaðar til að lýsa megindlegum upplýsingum um skammtasvörun á ennþá ítarlegri hátt, getur þurft viðbótarskammtahópa. Þessi mörk geta verið breytileg ef um er að ræða tilteknar gerðir prófunaríðefna (t.d. lyf handa mönnum) sem falla undir sértækar kröfur.

Markprófun

Ef skammtastærðatilraunir eða fyrirliggjandi gögn um skylda dýrastofna benda til þess að meðferðarfyrirkomulag með a.m.k. háskammti (sem lýst er hér á eftir) framkalli engin merkjanleg eiturhrif (þ.m.t. engin minnkun fjölgunar í beinmerg eða aðrar vísbendingar um frumueiturhrif í markvef), og ef ekki er reiknað með erfðaeiturhrifum á grundvelli erfðaeiturhrifarannsókna í glasi eða gagna um íðefni með skylda efnabyggingu, er heildarrannsókn með þremur skammtastærðum e.t.v. ekki talin nauðsynleg, að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að prófunaríðefnið eða -efnin nái út í markvefinn (beinmerg). Í slíkum tilvikum getur stök skammtastærð með háskammti verið fullnægjandi. Ef inngjafartímabilið er > 14 dagar er háskammturinn 1000 mg/kg líkamsþyngdar/dag. Ef inngjafartímabilið er 14 dagar eða minna er háskammturinn 2000 mg/kg líkamsþyngdar/dag.

Gjöf skammta

Taka skal tillit til fyrirséðrar váhrifaleiðar fyrir menn við tilhögun mælingar. Því má velja íkomuleiðir váhrifa, s.s. með fæðu, drykkjarvatni, staðbundnar, undir húð, um munn (með magaslöngu), með innöndun, í bláæð eða með ígræðslu, sem færð eru rök fyrir. Í öllum tilvikum skal velja íkomuleið sem tryggir nægileg váhrif á markvef(i). Alla jafna er ekki mælt með innsprautun í kviðarhol þar eð hún er ekki fyrirhuguð váhrifaleið fyrir menn og aðeins skal nota hana ef sérstök rök styðja það. Ef prófunaríðefninu er blandað í fóður eða drykkjarvatn, einkum ef um er að ræða staka skömmtun, skal þess gætt að hlé milli neyslu fóðurs og vatns og sýnatöku sé nægilegt til að hægt sé að greina áhrifin (sjá 33.–34. lið). Það ræðst af stærð tilraunadýrsins hve mikinn vökva hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun. Rúmmálið ætti alla jafna ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa að hámarki 2 ml/100g. Ef meira rúmmál en það er notað skal það rökstutt. Að undanskildum ertandi eða ætandi prófunaríðefnum, sem venjulega hafa þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að gjöf rúmmáls haldist stöðug í hlutfalli við líkamsþyngdina fyrir allar skammtastærðir.

Meðferðaráætlun

Prófunaríðefni eru yfirleitt gefin í einni meðferð en má gefa í fleiri áföngum, (þ.e. meðferðin fer fram tvisvar eða oftar á sama degi og skulu ekki líða nema 2–3 klukkustundir á milli) en þannig er auðveldara að gefa inn mikið rúmmál. Undir þessum kringumstæðum, eða þegar prófunaríðefnið er gefið við innöndun, skal áætlun um sýnatökutíma byggð á tímasetningu síðustu skömmtunar eða lokum váhrifa.

Fá gögn eru tiltæk um hentugleika aðferðarlýsingarinnar fyrir endurtekna skömmtun fyrir þessa prófun. Við aðstæður þar sem æskilegt er að samþætta þessa prófun við prófun á eiturhrifum eftir endurtekna skammta skal þess þó gætt að frumur í jafnskiptingu, sem eru með skemmdir á litningum, tapist ekki eins og kann að gerast með eitraða skammta. Slík samþætting er ásættanleg þegar hæsti skammturinn er stærri en eða jafn og háskammturinn (sjá 29. lið) og skammtahópi er gefinn háskammturinn meðan á meðferðinni stendur. Líta ber á smákjarnaprófunina (prófunaraðferð B.12) sem val á prófun í lífi fyrir litningabreytingar þegar samþætting við aðrar rannsóknir er æskileg.

Taka skal sýni úr beinmerg á tveimur mismunandi tímum eftir stakar meðferðir. Ef um nagdýr er að ræða skal fyrri sýnatakan eiga sér stað að liðnum þeim tíma sem þarf til að ljúka einni og hálfri lengd eðlilegs frumuhrings (sem alla jafna er 12–18 klst. eftir meðhöndlunartímabilið). Þar eð besti tíminn til að greina litningabreytingar er hugsanlega undir því kominn hversu langan tíma upptaka og efnaskipti prófunaríðefnisins eða -efnanna taka, sem og áhrif þess eða þeirra á hraða frumuhringsins, er mælt með því sýni séu tekin aftur 24 klukkustundum eftir fyrsta sýnatökutíma. Við fyrsta sýnatökutíma skulu allir skammtahópar meðhöndlaðir og sýnum safnað til greiningar; við síðari sýnatökutíma þarf þó eingöngu að gefa hæsta skammt. Ef notuð er skömmtun sem nær yfir lengri tíma en einn dag, byggt á vísindalegum rökum, skal alla jafna taka sýni einu sinni að liðinni allt að u.þ.b. einni og hálfri lengd eðlilegs frumuhrings frá lokameðferð.

Í kjölfar meðhöndlunar og fyrir töku sýna er viðeigandi skammti af metafasastöðvandi efni sprautað í kviðarhol dýranna (t.d. kolsemíði eða kolsisíni) og eftir það eru sýni tekin með hæfilegu millibili. Að því er varðar mýs er þetta millibil u.þ.b. 3–5 klukkustundir fyrir töku og að því er varðar rottur 2–5 klukkustundir. Frumur eru heimtar úr beinmerg, látnar bólgna upp, festar og litaðar og greindar m.t.t. litningabreytinga (12. heimild).

Athuganir

Gera skal almennar, klínískar athuganir á tilraunadýrunum og skrá klínísk einkenni a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Öll dýr skulu skoðuð a.m.k. tvisvar á dag á skömmtunartímabilinu með tilliti til dánar- og veikindatilvika. Öll dýr skulu vigtuð við upphaf rannsóknar, a.m.k. vikulega meðan á rannsóknum með endurteknum skömmtum stendur og við aflífun. Í rannsóknum sem vara í a.m.k. eina viku skal mæla fóðurát a.m.k. vikulega. Ef prófunaríðefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju í hvert skipti þegar skipt er um vatn og a.m.k. vikulega. Dýr sem sýna merki um umframeiturhrif sem ekki eru banvæn skulu aflífuð á mannúðlegan hátt áður en prófunartímabilinu lýkur (11. heimild).

Váhrif á markvef

Ef það er réttlætanlegt og ef engin önnur gögn um váhrif eru fyrir hendi (sjá 44. lið) skal taka blóðsýni á viðeigandi tíma eða tímum til að hægt sé að rannsaka blóðvökvagildi prófunaríðefnisins í þeim tilgangi að sýna fram á að það hafi orðið váhrif á beinmerg.

Undirbúningur beinmergs og litninga

Beinmergsfrumur eru sóttar í lærlegg eða sköflung dýranna strax eftir aflífun á mannúðlegan hátt, settar í undirþrýsta lausn og festar. Frumum í miðfasa er síðan strokið á sýnisgler og þær litaðar með viðurkenndum aðferðum (sjá 3. og 12. heimild).

Greining

Öll sýnisgler, þ.m.t. jákvæður og neikvæður samanburður, skulu kóðuð fyrir greiningu hvert um sig og valin af handahófi svo að talningafólk þekki ekki til meðhöndlunaraðstæðna.

Jafnskiptingarhlutfallið er mælikvarði á frumueiturhrif og skal ákvarðað í a.m.k. 1000 frumum á dýr fyrir hvert dýr sem hefur fengið meðferð (þ.m.t. jákvæð samanburðardýr) og ómeðhöndluð dýr eða dýr í neikvæða samanburðarhópnum sem fá leysi eða burðarefni.

Úr hverju dýri skal greina a.m.k. 200 frumur í miðfasa m.t.t. byggingarlegra litningabreytinga, með og án skarða (6. heimild). Ef rannsóknarsögulegur gagnagrunnur um neikvæðan samanburð sýnir að bakgrunnsmeðalgildi fyrir byggingarlegar litningabreytingar er < 1% á prófunarstofunni skal þó íhuga að telja viðbótarfrumur. Breytingar í litningsþráðum og litningum skulu skráðar aðskilið og þær flokkaðar samkvæmt undirgerðum (rof, víxlun). Verkferlin sem notuð eru á rannsóknarstofunni skulu tryggja að greiningar á litningabreytingum séu gerðar af vel þjálfuðu talningafólki og þær jafningjaryndar, ef við á. Þar eð viðurkennt er að undirbúningur sýnisglerja leiðir oft til þess að hluti frumnanna í miðfasa rofnar sem leiðir til þess að þær tapa við það litningum skal fjöldi þráðhafta í þeim frumum, sem eru taldar, ekki vera innan við $2n \pm 2$ þar sem n er fjöldi einlitna litninga fyrir viðkomandi tegund.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Meta skal, fyrir hvert dýr, jafnskiptingarhlutfallið, fjölda talinna frumna í miðfasa, fjölda breytinga fyrir hverja frumu í miðfasa og hundraðshluta frumna með einni eða fleiri byggingarlegum litningabreytingum. Skrá skal mismunandi tegundir byggingarlegra litningsbreytinga og tilgreina fjölda þeirra og tíðni í meðferðar- og samanburðarhópunum. Skörð, sem og fjöllitna frumur og frumur með innræna tvöföldun, eru skráð aðskilið. Tíðni skarða er skráð en er að jafnaði ekki tekin með í greiningunni á heildartíðni byggingarlegu litningabreytinganna. Ef engar vísbendingar eru um mismunandi svörun eftir kyni dýra er heimilt að sameina gögnin til tölfræðilegrar greiningar. Einnig skal greina frá gögnum um eiturhrif á dýr og klínísk einkenni.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Eftirfarandi viðmiðanir ákvarða ásættanleika prófunarinnar:

a) Gögnin um samskeiða neikvæðan samanburð eru talin ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar (sjá 11.–14. lið).

b) Samskeiða jákvæðir samanburðir eða samanburðir vegna talningar skulu vekja svaranir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum um jákvæðan samanburð og valda tölfræðilega marktækri aukningu í samanburði við neikvæða samanburðinn (sjá 20.–21. lið).

c) Viðeigandi fjöldi skammta og frumna hefur verið greindur.

d) Viðmiðanir fyrir vali á hæsta skammti eru í samræmi við það sem lýst er í 25.–28. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:

a) að minnsta kosti einn meðferðarhópur sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í tíðni frumna með byggingarlegar litningabreytingar (án skarða) í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) þessi aukning er skammtatengd a.m.k. á einum sýnatökutíma í mati með viðeigandi leitniprófun, og

c) einhver þessara niðurstaðna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson).

Ef einungis hæsti skammtur er rannsakaður á tilteknum sýnatökutíma telst prófunaríðefnið greinilega jákvætt ef það er tölfræðilega marktæk aukning í samanburði við samskeiða, neikvæða samanburðinn og niðurstöðurnar lenda utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson). Ráðleggingar um viðeigandi tölfræðiaðferðir er að finna í 13. heimild. Þegar greining á tengslum skammta og svörunar er framkvæmd skal greina a.m.k. þrjá meðhöndlaða skammtahópa. Í tölfræðilegum prófunum skal nota dýrið sem tilraunaeininguna. Jákvæðar niðurstöður úr prófun á litningabreytingum benda til þess að prófunaríðefnið kalli fram byggingarlegar litningabreytingar í beinmerg þeirra tegunda sem eru notaðar í prófuninni.

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð, ef:

a) enginn meðferðarhópur sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í tíðni frumna með byggingarlegar litningabreytingar (án skarða) í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) það er engin skammtatengd aukning á neinum sýnatökutíma í mati með viðeigandi leitniprófun,

c) allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson) og

d) beinmergur hefur komist í snertingu við prófunaríðefni.

Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við er að finna í 13. heimild. Merki um að beinmergur hafi komist í snertingu við prófunaríðefni geta m.a. komið fram í minnkun á jafnskiptingarhlutfalli eða í mælingu á blóðvökva eða blóði m.t.t. styrks prófunaríðefnisins eða -íðefnanna. Ef um er að ræða inngjöf í bláæð er ekki þörf á að sýna fram á snertingu við prófunaríðefni. Að öðrum kosti má nota gögn um upptöku, dreifingu, efnaskipti og útskilnað, sem fást úr sjálfstæðri rannsókn þar sem notuð er sama íkomuleið og sama tegund, til að sýna fram á að beinmergur hafi komist í snertingu við prófunaríðefni. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunaríðefnið ekki fram byggingarlegar litningabreytingar í beinmergsfrumum þeirrar dýrategundar sem er notuð í prófuninni.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða skýrri neikvæðri svörun.

Í tilvikum þar sem svörunin er ekki greinilega neikvæð eða greinilega jákvæð og til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu (t.d. væg eða óviss aukning) skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar á þeim tilraunum sem er lokið. Í sumum tilvikum getur verið gagnlegt að greina fleiri frumur eða gera endurtekna tilraun með breyttum tilraunaskilyrðum.

Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um að prófunaríðefnið framkalli annaðhvort jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að rannsóknin sé tvíræð.

Skrá skal tíðni fjöllitnunar og innræna tvöföldun miðfasa ásamt heildarmiðfasa aðskilið. Fjölgun á fjöllitna frumum eða innrænni tvöföldun í frumum getur verið vísbending um að prófunaríðefnið geti hamlað jafnskiptingarferlum eða framrás frumuhringsins (sjá 3. lið).

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Samantekt

Prófunaríðefni:

— uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur.

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Tilreiðsla prófunaríðefnis:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum/burðarefninu, ef þekkt,

— tilreiðsla blandna í fóður, drykkjarvatn eða til innöndunar,

— magngreiningar á samsetningum (t.d. stöðugleiki, einsleitni, nafnstyrkur), fari þær fram.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð og rökstuðningur fyrir notkun,

— fjöldi, aldur og kyn dýra,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— aðferð til að auðkenna dýrin hvert um sig,

— að því er varðar skammtímarannsóknir: þyngd hvers dýrs við upphaf og lok prófunar; að því er varðar rannsóknir sem standa lengur en eina viku: líkamsþyngd hvers dýrs meðan rannsókn stendur yfir og fóðurát. Hafa skal með dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— jákvæður og neikvæður samanburður (burðarefni/leysir),

— gögn úr skammtastærðarrannsókn hafi hún verið gerð,

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— upplýsingar um tilreiðslu prófunaríðefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— rök fyrir íkomuleið og hve lengi gjöfin stendur yfir,

— aðferðir til að sannreyna að prófunaríðefnið eða -íðefnin hafi náð út í almennu blóðrásina eða beinmerginn,

— raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar/dag) reiknuð út frá styrkleika prófunaríðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni og út frá neyslu, ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

— aðferð við aflífun,

— aðferð við verkjastillingu (ef notuð),

— nákvæm lýsing á meðferð og sýnatökuáætlunum og rökstuðningur fyrir valinu,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— auðkenni miðfasastöðvandi íðefnis, styrkur þess, skammtur og tímasetning gjafar fyrir sýnatöku,

— verklag við einangrun og varðveislu sýna,

— viðmiðanir fyrir talningu breytinga,

— fjöldi greindra frumna í miðfasa úr hverju dýri og fjöldi greindra frumna m.t.t. ákvörðunar á jafnskiptingarhlutfalli,

— viðmiðanir fyrir ásættanleika rannsóknarinnar,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar.

Niðurstöður:

— ástand dýranna fyrir prófunina og á meðan henni stendur, þ.m.t. merki um eiturhrif,

— jafnskiptingarhlutfall tilgreint sérstaklega fyrir hvert dýr,

— tegund og fjöldi breytinga og afbrigðilegra frumna, tilgreint sérstaklega fyrir hvert dýr,

— heildarfjöldi breytinga fyrir hvern hóp ásamt meðaltali og staðalfráviki,

— heildarfjöldi frumna með breytingum fyrir hvern hóp ásamt meðaltali og staðalfráviki,

— breytingar á litnun, komi þær fram, þ.m.t. tíðni fjöllitnunar og/eða innræn tvöföldun í frumum,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar,

— gögn sem sýna fram á að beinmergur hafi komist í snertingu við prófunaríðefni,

— gögn um samskeiða, neikvæðan og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan og jákvæðan samanburð ásamt sviðum, meðaltölum, staðalfráviki og 95% stýrimörkum dreifingar sem og tímabili, sem tekið var til, og fjölda athugana,

— viðmiðanir sem eru uppfylltar fyrir jákvæða eða neikvæða svörun.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Ályktun.

Tilvísanir.

HEIMILDIR:

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

4) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

9) Hayashi, M. et al. (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

13) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.'

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Mislitnun: öll frávik frá eðlilegum fjölda tvílitna (eða einlitna) litninga sem nema einum eða fleiri litningum en ekki ef um er að ræða fleiri heil sett eða heilt sett litninga (sjá fjöllitnun).

Þráðhaft: svæði á litningi þar sem spóluþræðir festast meðan á frumuskiptingu stendur og það gerir dótturlitningunum kleift að færast skipulega að skautum dótturfrumnanna.

Íðefni: efni eða blanda.

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að einstakir litningsþræðir rofna eða rofna og tengjast síðan aftur öðrum þráðum.

Litningabreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að báðir litningsþræðirnir rofna á sama stað eða rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Innræn tvöföldun: ferli þar sem kjarninn gengur ekki inn í jafnskiptingarferlið eftir S-fasa DNA-eftirmyndunar heldur byrjar annan S-fasa. Út úr þessu koma litningar með 4, 8,16..., litningsþráðum.

Skarð: litlaus skemmd sem er mjórri en sem nemur vídd eins litningsþráðar og þar sem uppröðun litningsþráðanna er nálægt eðlilegu.

Jafnskiptingarhlutfall: hlutfallið milli fjölda frumna í jafnskiptingu og heildarfjölda frumna í hóp, sem er mæling á fjölgun í þeim frumuhóp.

Breyting á fjölda: breyting á fjölda litninga frá því sem eðlilegt er í þeim dýrum sem eru notuð (mislitnun).

Fjöllitnun: breyting á litningafjölda sem felur í sér breytingu á fjölda í heilu setti litninga í stað breytingar á fjölda í hluta af setti litninga (sjá mislitnun).

Byggingarleg litningabreyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun í miðfasa frumuskiptingar sem úrfelling og bútar, breytingar innan litninga eða milli litninga.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

———

2. viðbætir

ÞÁTTBUNDIN TILHÖGUN TIL AÐ GREINA KYNJAMISMUN Í RANNSÓKNUM Í LÍFI Á LITNINGABREYTINGUM

Þáttbundin tilhögun og greining hennar

Í þessari tilhögun eru a.m.k. 5 karldýr og 5 kvendýr prófuð við hvern styrk sem leiðir til þess að í þessari tilhögun eru notuð a.m.k. 40 dýr (20 karldýr og 20 kvendýr, ásamt viðeigandi jákvæðum samanburði).

Tilhögunin, sem er með einfaldari þáttbundnum tilhögunum, er jafngild tvíhliða dreifnigreiningu þar sem kyn og styrkgildi eru aðaláhrifin. Hægt er að greina gögnin með því að nota margs konar, staðlaða tölfræðihugbúnaðarpakka s.s. SPSS, SAS, STATA og Genstat ásamt því að nota R.

Greiningin skiptir breytileikanum í gagnamenginu milli kynja, styrkleika og verkunar milli kynjanna og styrkleikanna. Hver skilyrði eru prófuð með samanburði við áætlun fyrir breytileikann milli samanburðardýranna innan dýrahópa af sama kyni sem fá sama styrk. Allar upplýsingar um undirliggjandi aðferðafræði eru aðgengilegar í mörgum stöðluðum tölfræðikennslubókum (sjá tilvísanir) og í hjálparbúnaðinum sem fylgir tölfræðipökkunum.

Greiningunni er haldið áfram með því að skoða verkun kyns x styrks í dreifnigreiningartöflunni (ANOVA) ([1]). Sé marktæk verkun ekki til staðar gefa samanlögð gildi fyrir bæði kyn eða öll styrkleikastig gildar tölfræðilegar prófanir milli gilda sem grundvallast á samanlögðum breytileika innan hóps samkvæmt dreifnigreiningunni.

Greiningunni er haldið áfram með því að skipta áætluðum breytileika milli styrkleika í samanburðarföll sem gera það kleift að prófa fyrir línulegum samanburðarföllum og annars stigs samanburðarföllum í svörunum fyrir öll styrkleikastig. Ef marktæk verkun er til staðar milli kyns x styrks er einnig hægt að skipta þessari verkun í línuleg samanburðarföll x kyn og annars stigs samanburðarföll x kyn. Með þessu er hægt að prófa hvort styrksvörunin sé samsvarandi fyrir bæði kynin eða hvort það sé munur á svörun milli kynjanna.

Hægt er að nota áætlaðan, samanlagðan breytileika innan hóps til að gera paraðar prófanir á mismuninum milli meðaltalsins. Hægt er að gera þennan samanburð milli meðaltals fyrir bæði kynin og milli meðaltals fyrir mismunandi styrkleikastig, s.s. fyrir samanburð við neikvæð samanburðargildi. Í þeim tilvikum þar sem er marktæk virkni er hægt að gera samanburð á meðaltali mismunandi styrkleika fyrir sama kyn eða á meðaltali fyrir bæði kynin við sama styrk.

Tilvísanir

Fjallað er um kenninguna, tilhögunina, aðferðafræðina, greininguna og túlkunina á þáttbundnum tilhögunum í mörgum tölfræðikennslubókum, allt frá einföldustu tveggja þátta greiningu til flóknari forma sem eru notuð í aðferðafræði við tilhögun tilrauna. Eftirfarandi listi er ekki tæmandi. Í sumum bókum eru útreiknuð dæmi sambærilegrar tilhögunar, í sumum tilvikum með kóða til að keyra greininguna með aðstoð ýmissa hugbúnaðarpakka.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

([1]) Tölfræðingar sem velja líkansaðferðir, s.s. almenn línuleg líkön (e. *General Linear Models* (GLM)), geta notað aðra en sambærilega aðferð við greininguna en þurfa þó ekki endilega að leiða út hefðbundna dreifnigreiningartöflu sem byggir á algrímskri aðferð (e. *algorithmic approach*) til að reikna út tölfræðilegar upplýsingar áður en tölvur komu til sögunnar.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

5) Í stað kafla B.12 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.12 **Prófun á smákjörnum rauðkorna hjá spendýrum**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 474 um prófanir (2016). Hún er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Skjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar, sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á þessum viðmiðunarreglunum um prófanir (1. heimild), hefur verið þróað.

Prófun í lífi á smákjörnum hjá spendýrum hentar einkum til að meta hættu á erfðaeiturhrifum þar sem þættir í efnaskiptum, lyfjahvörf og viðgerðarferli DNA eru virk í lífi og stuðla að svörun, þótt þessir þættir séu hugsanlega breytilegir eftir dýrategundum. Prófun í lífi er einnig gagnleg til frekari rannsóknar á erfðaeiturhrifum sem koma fram við prófun í glasi.

Prófun í lífi á smákjörnum hjá spendýrum er notuð til að greina skemmdir sem prófunaríðefni veldur á litningum eða jafnskiptingarkerfum rauðkornamæðra. Með prófuninni er myndun smákjarna metin með því að skoða rauðkorn úr beinmerg eða blóðfrumur úr útæðakerfi dýra, yfirleitt nagdýra.

Tilgangur smákjarnaprófunarinnar er að sanngreina íðefni sem valda frumuerfðafræðilegum skaða þannig að til verða smákjarnar með annaðhvort eftirliggjandi litningabrotum eða heilum litningum.

Þegar rauðkornamóðir í beinmerg þroskast í óþroskað rauðkorn (stundum einnig nefnt fjöllita rauðkorn eða netfrumur) þrýstist meginkjarninn út og hafi smákjarni myndast í frumunni getur hann orðið eftir í umfryminu. Í þessum frumum er enginn meginkjarni og fyrir vikið er auðveldara að sjá eða greina smákjarnana. Ef óþroskuð, smákjörnótt rauðkorn eru fleiri í dýrum, sem hafa fengið meðferð, en venja er til er það vísbending um framkallaðar byggingarlegar litningabreytingar eða breytingar á litningafjölda.

Nýmynduð smákjörnótt rauðkorn eru greind og ákvörðuð með litun og því fylgt eftir annað hvort með sjónrænni talningu í smásjá eða með sjálfvirkri greiningu. Notkun sjálfvirkrar talningarstöðvar (e. *automated scoring platform*) auðveldar mjög talningu á nægilegu magni óþroskaðra rauðkorna í útæðablóði eða beinmerg fullvaxinna dýra. Slíkar stöðvar geta komið í stað handvirks mats (2. heimild). Samanburðarrannsóknir hafa sýnt að slíkar aðferðir, þar sem viðeigandi kvörðunarstaðlar eru notaðir, geti veitt betri fjölsetra samanburðarnákvæmni og einseturssamanburðarnákvæmni og næmi en handvirk talning í smásjá (3. og 4. heimild). Sjálfvirk kerfi sem geta mælt hlutfall smákjörnóttra rauðkorna eru m.a. frumuflæðisjá (5. heimild), myndgreiningarstöðvar (6. og 7. heimild) og frumuflokkarar með leysigeislaskönnun (*laser scanning cytometers*) (8. heimild).

Hægt er að aðgreina litningabrot frá heilum litningum með margs konar viðmiðunum þó að það sé alla jafna ekki gert sem hluti af prófuninni. Meðal annars með því að sanngreina hvort þráðhald eða þráðhaft sé í smákjörnunum eða ekki, sem er hvort tveggja dæmigert fyrir heila litninga. Ef þráðhald eða þráðhaft er ekki til staðar bendir það til þess að smákjarninn innihaldi eingöngu litningabrot en sé það til staðar gefur það til kynna litningafækkun.

Skilgreiningar á íðorðanotkun eru settar fram í 1. viðbæti.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

Í þessari prófun er beinmergur úr ungum, fullvöxnum nagdýrum markvefur fyrir erfðafræðilegar skemmdir þar eð rauðkorn myndast í þeim vef. Mæling á smákjörnum í óþroskuðum rauðkornum í útæðablóði er ásættanleg í öðrum tegundum spendýra ef sýnt hefur verið fram á hæfilegt næmi til að greina íðefni, sem orsaka byggingarlegar litningabreytingar eða breytingar á litningafjölda í þessum frumum (með virkjun smákjarna í óþroskuðum rauðkornum), og vísindaleg rök hafa verið sett fram. Mikilvægasti endapunkturinn er hlutfall smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna. Einnig er hægt að nota hlutfall þroskaðra rauðkorna sem innihalda smákjarna í útæðablóði sem endapunkt hjá tegundum sem eru án sterks vals í milta gegn smákjörnóttum frumum og ef dýr eru í stöðugri meðferð lengur en sem nemur líftíma rauðkorna í tegundinni sem notuð er (t.d. 4 vikur eða lengur í músum).

Þessi prófun hentar e.t.v. ekki ef sannanir eru fyrir því að prófunaríðefnið eða -íðefnin, eða hvarfgjarnt/hvarfgjörn umbrotsefni þess, nái ekki út í markvefinn.

Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu á viðeigandi hátt. Ef beinmergur er notaður eru dýrin aflífuð á mannúðlegan hátt þegar hæfilegur tími er liðinn frá meðferðinni og síðan er beinmergurinn tekinn, sýni útbúin og þau lituð (9.–15. heimild). Ef útæðablóð er notað er blóð tekið þegar hæfilegur tími er liðinn frá meðferðinni og síðan eru sýni útbúin og lituð (12. og 16.–18. heimild). Þegar bráðameðferð er veitt er mikilvægt að velja þá tímasetningu fyrir heimtur á beinmerg eða blóði þegar hægt er að greina meðferðartengda virkjun smákjörnóttra óþroskaðra rauðkorna. Ef um er að ræða sýni úr útæðablóði þarf einnig að hafa liðið nægilegur tími til að þessir þættir birtist í hringrás blóðsins. Sýni eru skoðuð í leit að smákjörnum, annað hvort sjónrænt með greiningu í smásjá, myndgreiningu, frumuflæðissjárgreiningu eða með frumumælingu með leysigeislaskönnun.

SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

Hæfnirannsóknir

Rannsóknarstofan skal hafa sýnt fram á getu til að endurtaka þær niðurstöður sem reiknað er með út frá útgefnum gögnum (17. og 19.–22. heimild) um tíðni smákjarna með að lágmarki tveimur jákvæðum samanburðaríðefnum (þ.m.t. veikar svaranir af völdum lítilla skammta af jákvæða samanburðinum), s.s. þeim sem eru talin upp í töflu 1 og með samrýmanlegum samanburði með burðarefni eða leysi (sjá 26. lið) til að staðfesta að nægileg reynsla sé af framkvæmd greiningarinnar áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Í þessum tilraunum skal nota skammta sem valda samanburðarnákvæmri og skammtatengdri aukningu og sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins í vefnum sem verið er að rannsaka (beinmerg eða útæðablóð) og nota skal talningaraðferðina sem notuð verður á rannsóknarstofunni. Þessi krafa á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltæka grunna með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 14.-18. lið.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

Meðan á hæfnirannsóknunum stendur skal rannsóknarstofan ákvarða:

— svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu, og

— svið og dreifingu neikvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu.

Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt viðmiðunargögn, ef þau liggja fyrir. Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um rannsóknarsögulega samanburðardreifingu skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka þeirrar samanburðadreifingar. Rannsóknarsögulegur gagnagrunnur rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð skal vera tölfræðilega sterkur til að tryggja getu rannsóknarstofunnar til að meta dreifingu gagna sinna um neikvæðan samanburð. Í heimildum er lagt til að e.t.v. þurfi a.m.k.10 tilraunir en æskilegra væri að hann samanstæði af a.m.k. 20 tilraunum sem eru gerðar við sambærileg tilraunaskilyrði. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „*C-charts, X-bar charts"* (23. heimild)) til að greina hversu breytileg gögn þeirra eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi. Frekari ráðleggingar um uppbyggingu rannsóknarsögulegra gagna og notkun þeirra (þ.e. viðmiðanir fyrir hvaða gögn eru höfð með og hver ekki í rannsóknarsögunni og ásættanleikaviðmiðanir fyrir tiltekna tilraun) er að finna í 24. heimild.

Ef rannsóknarstofan lýkur ekki við nægilegan fjölda tilrauna til að staðfesta tölfræðilega sterka dreifingu neikvæða samanburðarins (sjá 11. lið) meðan á hæfnirannsóknum stendur (sem lýst er í 13. lið), er ásættanlegt að byggja upp dreifinguna meðan á fyrstu venjubundnu prófununum stendur. Þessi aðferð skal fylgja tilmælunum sem sett eru fram í 24. heimild og niðurstöður fyrir neikvæðan samanburð, sem fást úr þessum tilraunum, skulu vera áfram í samræmi við birt neikvæð viðmiðunargögn.

Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til áhrifa þeirra á niðurstöður þannig að þær séu í samræmi við fyrirliggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Einungis verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði ef sérfræðingar ákvarða að hann sé ólíkur fyrri dreifingu (sjá 15. lið). Meðan honum er komið á aftur er e.t.v. ekki þörf á fullkomnum gagnagrunni um neikvæða samanburði til að unnt sé að framkvæma raunverulega prófun, að því tilskildu að rannsóknarstofan geti sýnt fram á að samhliða neikvæð samanburðargildi þeirra séu annað hvort í samræmi við fyrri gagnagrunn þeirra eða samsvarandi birt gögn.

Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af hlutfalli smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna í hverju dýri. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði. Ef gögn um samskeiða neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka fyrir samanburði getur þó verið ásættanlegt að hafa þau með í rannsóknasögulegri samanburðardreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfarar og að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá 15. lið) og engin merki um tæknileg eða mannleg mistök.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Val á dýrategund

Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Nota má mýs, rottur eða aðrar heppilegar tegundir spendýra. Ef útæðablóð er notað verður að staðfesta að fjarlæging smákjörnóttra frumna í milta úr blóðrásinni spilli ekki greiningunni á framkölluðum smákjörnum í tegundinni sem verður fyrir valinu. Sýnt hefur verið fram á þetta með skýrum hætti varðandi útæðablóð úr músum og rottum (2. heimild). Vísindaleg rök fyrir notkun á öðrum tegundum en rottum og músum skulu sett fram í skýrslunni. Ef aðrar tegundir en nagdýr eru notuð er mælt með því að mælingin á framkölluðum smákjörnum verði felld inn í aðra viðeigandi eiturhrifaprófun.

Aðbúnaður dýra og fóðrun

Að því er varðar rottur skal hiti í vistarverum dýranna vera 22 °C (±3 ºC). Þótt æskilegt rakastig sé 50–60%, skal það að minnsta kosti vera 40% og helst ekki fara yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunaríðefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Nagdýr skulu vera í búri í litlum hópum (ekki fleiri en fimm saman) af sama kyni og sama meðferðarhóp ef árásargirni er ekki vænst, helst í búrum með gegnheilu gólfi með viðeigandi umhverfisfjölbreytni. Dýr mega aðeins vera hvert í sínu búri ef fyrir því eru vísindaleg rök.

Undirbúningur dýra

Að jafnaði eru notuð ung, heilbrigð, fullvaxin dýr (að því er varðar nagdýr, helst 6–10 vikna gömul við upphaf meðferðar þótt dálítið eldri dýr séu einnig ásættanleg) og þeim slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Hvert dýr skal auðkennt sérstaklega með mannúðlegri aðferð með lágmarks inngripi (t.d. með merkingu með hring, ífestu spjaldi, örflögu eða lífkenni, en ekki mörkun eyrna og afklippingu táa) og það látið laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Forðast skal víxlmengun af völdum jákvæða samanburðarins og prófunaríðefnisins. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

Tilreiðsla skammta

Prófunaríðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með viðeigandi leysum eða burðarefnum eða blandað í fóður eða drykkjarvatn áður en þau eru skömmtuð dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunaríðefni óblönduð eða þynnt fyrir skammtagjöf. Ef greina á váhrif við innöndun má gefa prófunaríðefni sem gas, gufu eða sem fast/fljótandi úðaefni, allt eftir eðlisefnafræðilegum eiginleikum þeirra. Nota skal ferskar blöndur af prófunaríðefninu nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu og tiltaki viðeigandi geymsluskilyrði.

Prófunarskilyrði

Leysir/burðarefni

Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og skal ekki geta hvarfast við prófunaríðefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Dæmi um algengan samrýmanlegan leysi/burðarefni er vatn, lífeðlisfræðileg saltlausn, metýlsellulósalausn, saltlausn úr natríumkarboxýmetýlsellulósa, ólífuolía og maísolía. Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg eða útgefin samanburðargögn sem sýna að ódæmigerði leysirinn/burðarefnið, sem varð fyrir valinu, framkalli ekki smákjörnun eða önnur skaðleg áhrif skal gera upphafsrannsókn til að byggja upp ásættanleika fyrir burðarefnissamanburðinn.

Samanburðir

Jákvæðir samanburðir

Að jafnaði skal hafa hóp dýra í hverri prófun sem er meðhöndlaður með jákvæðu samanburðaríðefni. Heimilt er að falla frá þessu þegar prófunarstofa hefur sýnt fram á hæfni við framkvæmd prófunarinnar og hefur ákvarðað svið jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu. Ef samskeiða jákvæður samanburðarhópur er ekki hafður með skal vera talningarsamanburður (sýnisgler með festum og ólituðum sýnum eða sýni frumusviflausnar, eins og við á fyrir talningaraðferðina) í hverri tilraun. Þessu er hægt að ná fram með því að hafa með í talningu rannsóknarinnar viðeigandi viðmiðunarsýni, sem hafa verið tekin og geymd, úr aðskilinni tilraun með jákvæðum samanburði sem fer reglulega fram (t.d. á 6–18 mánaða fresti), t.d. meðan á hæfnisprófun stendur og reglulega eftir það, ef nauðsyn krefur.

Jákvæð samanburðaríðefni skulu framkalla með áreiðanlegum hætti greinanlega aukningu smákjarna umfram sjálfsprottið magn. Þegar notuð er handvirk talning í smásjá skal velja skammtastærðir fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að talningafólk geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnin. Það er ásættanlegt að ákomuleið fyrir jákvæða samanburðinn sé önnur en sú sem er notuð fyrir prófunaríðefnið, með notkun á ólíkum meðferðaráætlunum, og að sýnataka sé aðeins í eitt skipti. Auk þess má kanna hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, eftir því sem við á. Dæmi um jákvæð samanburðaríðefni er að finna í töflu 1.

Tafla 1

Dæmi um jákvæð samanburðaríðefni

Íðefni og CAS-númer
Etýlmetansúlfónat [CAS-númer 62-50-0]
Metýlmetansúlfónat [CAS-númer 66-27-3]
Etýlnítrósóúrea [CAS-númer 759-73-9]
Mítómýsín C [CAS-númer 50-07-7]
Sýklófosfamíð(mónóhýdrat) [CAS-númer 50-18-0 (CAS-númer 6055-19-2)]
Tríetýlenmelamín[CAS-númer 51-18-3]
Kolsisín [CAS-númer 64-86-8] eða vínblastín [CAS-númer 865-21-4] — efni sem valda mislitnun

Neikvæður samanburður

Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með neikvæðan samanburðarhóp dýra sem er meðhöndlaður á sama hátt og meðferðarhóparnir að öðru leyti en því að hann fær ekki prófunaríðefnið. Ef leysir/burðarefni er notað við inngjöf prófunaríðefnisins skal gefa samanburðarhópnum þann leysi/burðarefni. Hins vegar, ef sýnt hefur verið fram á samræmi í breytileika milli dýra og tíðni frumna sem smákjarnar finnast í með rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæðan samanburð á hverjum sýnatökutíma fyrir prófunarstofuna, er e.t.v. einungis þörf á einni sýnatöku fyrir neikvæða samanburðinn. Ef ein sýnataka er notuð fyrir neikvæða samanburði skal það vera fyrsti sýnatökutíminn í rannsókninni.

Ef útæðablóð er notað má taka sýni fyrir meðferðina í stað samskeiða neikvæða samanburðarins að því er varðar skammtímarannsóknir ef gögnin sem af þessu leiða eru í samræmi við rannsóknarsögulega gagnagrunninn fyrir prófunarstofuna. Að því er varðar rottur þá hefur verið sýnt fram á að taka sýna í litlu magni fyrir meðferð (t.d. undir 100 µl/dag) hefur lágmarksáhrif á bakgrunnstíðni smákjarna (25. heimild).

VERKFERLI

Fjöldi og kyn dýra

Alla jafna er smákjarnasvörunin svipuð hjá karl- og kvendýrum og því má gera flestar rannsóknir á hvoru kyni sem er (26. heimild). Gögn sem sýna fram á mismun sem máli skiptir á milli karl- og kvendýra (t.d. mismun á altækum eiturhrifum, efnaskiptum, lífaðgengi, eiturhrifum í beinmerg o.s.frv., þ.m.t. er t.d. skammtastærðarannsókn) myndu styðja notkun beggja kynja. Í því tilviki getur verið rétt að gera rannsókn á báðum kynjum, t.d. sem hluta af rannsókn á eiturhrifum við endurtekna skammta. Það gæti verið rétt að nota þáttbundna tilhögun ef bæði kynin eru notuð. Upplýsingar um hvernig á að greina gögnin með notkun þessarar tilhögunar er að finna í 2. viðbæti.

Hópastærðir við upphaf rannsóknarinnar skulu ákvarðaðar með það fyrir augum að með þeim fáist a.m.k. 5 greiningarbær dýr af öðru kyninu, eða af hvoru kyni ef bæði er notuð, á hvern hóp. Ef váhrif á menn frá íðefnum eru hugsanlega kynbundin, eins og raunin er með sum lyfjaefni, skal prófunin fara fram á því kyni sem við á hverju sinni. Til leiðbeiningar varðandi dæmigerðan hámarksfjölda dýra myndi rannsókn á beinmerg, sem er gerð í samræmi við þættina sem eru fastsettir í 37. lið, með þremur skammtahópum og samskeiða neikvæðum og jákvæðum samanburði (hver hópur samanstendur af fimm dýrum af sama kyninu), útheimta á bilinu 25 til 35 dýr.

Skammtastærðir

Ef engin nothæf gögn liggja þegar fyrir, sem gagnast við val á skömmtum, og skammtastærðarannsókn er framkvæmd skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni og kyni tilraunadýrs og eru notuð í meginrannsókninni (27. heimild). Markmið rannsóknarinnar skal vera að greina hámarksþolsskammt, sem er skilgreindur sem hæsti þolanlegi skammtur án vísbendinga um rannsóknartakmarkandi eiturhrif, í hlutfalli við lengd rannsóknartímabilsins (framkallar t.d. þyngdartap eða frumueiturhrif í blóðfrumnamyndandi kerfi, en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun á mannúðlegan hátt nauðsynlega (28. heimild)).

Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram eiturhrif í beinmerg (t.d. hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum í beinmerg eða útæðablóði minnkar um meira en 50%, en þó ekki í minna en 20% af samanburðargildinu). Við greiningu CD71-jákvæðra frumna í blóðrás útæðablóðs (þ.e. með frumuflæðissjárgreiningu) hefur þessi mjög ungi hluta óþroskaðra rauðkorna þó hraðari svörun við ögranir af völdum eitrunar en hið stærra RNA-jákvæða þýði óþroskaðra rauðkorna. Tilhögun með bráðum váhrifum kann því að fylgja merkjanlega hærri eiturhrif við rannsókn á CD71-jákvæða óþroskaða rauðkornahlutanum í samanburði við rannsóknirnar sem greina óþroskuð rauðkorn út frá innihaldi af RNA. Af þessum sökum er hægt að skilgreina hæstu skammtastærð fyrir prófunaríðefni sem valda eiturhrifum, þegar tilraunir standa yfir í fimm daga eða færri, sem skammtinn sem veldur tölfræðilega marktækri minnkun á hlutfalli CD71-jákvæðra óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum en ekki í minna en 5% af samanburðargildinu (29. heimild).

Íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, eða vekja afeitrunarferla sem geta leitt til minnkunar á váhrifum eftir langtímainngjöf, geta verið undantekningar frá viðmiðunum um skammtaákvörðun og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig.

Til að fá fram upplýsingar um skammtasvörun skal í heildstæðri rannsókn taka með neikvæðan samanburðarhóp og minnst þrjár skammtastærðir sem eru almennt aðskildar með stuðli sem nemur 2 en ekki meira en 4. Ef prófunaríðefnið framkallar ekki eiturhrif í skammtastærðarannsókn, eða byggt á fyrirliggjandi gögnum, skal hæsti skammtur fyrir inngjafartímabil sem er 14 dagar eða meira vera 1000 mg/kg líkamsþyngd/dag eða 2000 mg/kg/líkamsþyngd/dag fyrir inngjafartímabil sem er styttra en 14 dagar. Ef prófunaríðefnið veldur eiturhrifum skal hámarksþolsskammtur þó vera hæsti skammtur sem er gefinn og skammtastærðirnar sem eru notaðar skulu helst spanna bilið frá mestu eiturhrifum niður í skammt sem framkallar lítil eða engin eiturhrif. Ef eiturhrif í markvefjum (beinmerg) koma fram við allar skammtastærðirnar sem eru prófaðar er ráðlagt að gera frekari rannsóknir á skömmtum sem eru ekki eitraðir. Í rannsóknum, sem eru ætlaðar til að lýsa megindlegum upplýsingum um skammtasvörun á ennþá ítarlegri hátt, getur þurft viðbótarskammtahópa. Þessi mörk geta verið breytileg ef um er að ræða tilteknar gerðir prófunaríðefna (t.d. lyf handa mönnum) sem falla undir sértækar kröfur.

Markprófun

Ef skammtastærðatilraunir eða fyrirliggjandi gögn um skylda dýrastofna benda til þess að meðferðarfyrirkomulag með a.m.k. háskammti (sem lýst er hér á eftir) framkalli engin merkjanleg eiturhrif (þ.m.t. engin minnkun fjölgunar í beinmerg eða aðrar vísbendingar um frumueiturhrif í markvef), og ef ekki er reiknað með erfðaeiturhrifum á grundvelli erfðaeiturhrifarannsókna í glasi eða gagna um íðefni með skylda efnabyggingu, er heildarrannsókn með þremur skammtastærðum e.t.v. ekki talin nauðsynleg, að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að prófunaríðefnið eða -efnin nái út í markvefinn (beinmerg). Í slíkum tilvikum getur stök skammtastærð með háskammti verið fullnægjandi. Þegar inngjöf á sér stað í 14 daga eða meira er háskammturinn 1000 mg/kg líkamsþyngdar/dag. Ef inngjafartímabil eru styttri en 14 dagar er háskammtur 2000 mg/kg líkamsþyngd/dag.

Gjöf skammta

Taka skal tillit til fyrirséðrar váhrifaleiðar fyrir menn við tilhögun mælingar. Því má velja íkomuleiðir váhrifa, s.s. með fæðu, drykkjarvatni, staðbundnar, undir húð, um munn (með magaslöngu), með innöndun, í bláæð eða með ígræðslu, sem færð eru rök fyrir. Í öllum tilvikum skal velja íkomuleið sem tryggir nægileg váhrif á markvef(i). Alla jafna er ekki mælt með innsprautun í kviðarhol þar eð hún er ekki fyrirhuguð váhrifaleið fyrir menn og aðeins skal nota hana ef sérstök rök styðja það. Ef prófunaríðefninu er blandað í fóður eða drykkjarvatn, einkum ef um er að ræða staka skömmtun, skal þess gætt að hlé milli neyslu fóðurs og vatns og sýnatöku sé nægilegt til að hægt sé að greina áhrifin (sjá 37. lið). Hámarksrúmmál vökva sem hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti alla jafna ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa að hámarki 2 ml/100g. Ef meira rúmmál en það er notað skal það rökstutt. Að undanskildum ertandi eða ætandi prófunaríðefnum, sem venjulega hafa þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að gjöf rúmmáls haldist stöðug í hlutfalli við líkamsþyngdina fyrir allar skammtastærðir.

Meðferðaráætlun

Meðferð skal helst fara fram tvisvar eða oftar þar sem inngjöf er með 24 klst. millibili einkum þegar þessi prófun er felld inn í aðrar eiturhrifarannsóknir. Að öðrum kosti er hægt að hafa meðferðina í einni inngjöf ef fyrir því eru vísindaleg rök (t.d. vitað er að prófunaríðefni stoppi frumuhring). Prófunaríðefni má einnig gefa inn í fleiri áföngum, þ.e. meðferðin fer fram tvisvar eða oftar á sama degi og skulu ekki líða nema 2–3 klukkustundir á milli, en þannig er auðveldara að gefa inn mikið rúmmál. Undir þessum kringumstæðum, eða þegar prófunaríðefnið er gefið við innöndun, skal áætlun um sýnatökutíma byggð á tímasetningu síðustu skömmtunar eða lokum váhrifa.

Framkvæma má prófunina á músum eða rottum á þrjá vegu:

a) Dýrin fá meðferð einu sinni með prófunaríðefninu. Sýni úr beinmerg eru tekin a.m.k. tvisvar (úr óháðum dýrahópum) með hæfilegu millibili og skal sýnataka ekki hefjast fyrr en 24 klukkustundum eftir meðferð og henni ljúka ekki síðar en 48 klukkustundum eftir meðferð, nema vitað sé að prófunaríðefnið hafi óvenjulega langan helmingunartíma. Það skal stutt rökum ef sýni eru tekin áður en 24 klukkustundir eru liðnar frá meðhöndlun. Sýni úr útæðablóði eru tekin a.m.k. tvisvar (úr sama hóp dýra) með hæfilegu millibili og skal sýnataka hefjast ekki fyrr en 36 klst. eftir meðferð og henni ljúka ekki síðar en 72 klukkustundum eftir meðferð. Við fyrsta sýnatökutíma skulu allir skammtahópar meðhöndlaðir og sýnum safnað til greiningar; við síðari sýnatökutíma þarf þó eingöngu að gefa hæsta skammt. Komi jákvæð svörun fram við eina sýnatökuna er ekki þörf á frekari sýnatökum nema þörf sé á megindlegum upplýsingum um skammtasvörun. Tímasetning heimtar, sem lýst er, leiðir af hraðafræði smákjarna varðandi birtingu og hvarf þeirra í þessum tveimur vefjahlutum.

b) Ef meðferð fer fram tvisvar á dag (t.d. meðferð tvisvar sinnum á 24 klukkustunda fresti) skulu sýni tekin einu sinni á tímabilinu frá því að 18–24 klukkustundir eru liðnar frá lokameðferð, ef um beinmerg er að ræða, eða einu sinni á tímabilinu frá því að 36–48 klukkustundir eru liðnar frá lokameðferð ef um útæðablóð er að ræða (30. heimild). Tímasetning heimtar, sem lýst er, leiðir af hraðafræði smákjarna varðandi birtingu og hvarf þeirra í þessum tveimur vefjahlutum.

c) Ef meðferð fer fram þrisvar á dag eða oftar (t.d. meðferð þrisvar eða oftar með u.þ.b. 24 tíma hléum) skulu sýni úr beinmerg tekin eigi síðar en 24 klst. eftir lokameðferð og úr útæðablóði eigi síðar en 40 klst. eftir lokameðferð (31. heimild). Þessi meðferðarmöguleiki gerir það kleift að sameina halastjörnumælinguna (t.d. sýnataka 2–6 klst. eftir lokameðferð) og smákjarnaprófunina og samþætta smákjarnaprófunina við rannsóknir á eiturhrifum við endurtekna skammta. Fyrirliggjandi gögn bentu til þess að hægt væri að sjá merki um framköllun smákjarna innan þessa víðari tímaramma þegar þrjár eða fleiri inngjafir hafa átt sér stað (15. heimild).

Hægt er að nota annað fyrirkomulag við skömmtun eða sýnatöku, ef við á og fyrir því eru vísindaleg rök, og til að auðvelda samþættingu við aðrar eiturhrifaprófanir.

Athuganir

Gera skal almennar, klínískar athuganir á tilraunadýrunum og skrá klínísk einkenni a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Öll dýr skulu skoðuð a.m.k. tvisvar á dag á skömmtunartímabilinu með tilliti til dánar- og veikindatilvika. Öll dýr skulu vigtuð við upphaf rannsóknar, a.m.k. vikulega meðan á rannsóknum með endurteknum skömmtum stendur og við aflífun. Í rannsóknum sem vara í a.m.k. eina viku skal mæla fóðurát a.m.k. vikulega. Ef prófunaríðefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju í hvert skipti þegar skipt er um vatn og a.m.k. vikulega. Dýr sem sýna merki um umframeiturhrif sem ekki eru banvæn skulu aflífuð á mannúðlegan hátt áður en prófunartímabilinu lýkur (28. heimild). Við tilteknar aðstæður er hægt að vakta líkamshita dýra því ofurhiti og lágur líkamshiti af völdum meðferðar hefur átt þátt í að gefa falskar niðurstöður (32.–34. heimild).

Váhrif á markvef

Ef það er réttlætanlegt og ef engin önnur gögn um váhrif eru fyrir hendi (sjá 48. lið) skal taka blóðsýni á viðeigandi tíma eða tímum til að hægt sé að rannsaka blóðvökvagildi prófunaríðefnisins í þeim tilgangi að sýna fram á að það hafi orðið váhrif á beinmerg.

Undirbúningur á beinmerg eða blóði

Beinmergsfrumur eru venjulega sóttar í lærlegg eða sköflung dýrs strax eftir aflífun á mannúðlegan hátt. Yfirleitt eru frumur teknar, sýni með þeim útbúin og þau lituð með viðurkenndum aðferðum. Hægt er að taka lítið magn af útæðablóði samkvæmt fullnægjandi kröfum um velferð dýra, annað hvort með því að nota aðferð sem gerir tilraunadýrinu kleift að lifa, s.s. með blóðtöku úr rófubláæð eða annarri heppilegri æð, eða með hjartaástungu eða sýnatöku úr stórri æð við aflífun dýrs. Að því er varðar rauðkorn úr beinmerg eða útæðablóði, eftir því hvaða greiningaraðferð er notuð, er hægt að lita frumur þegar í stað með viðlífslitun (16.–18. heimild), stroksýni eru þá útbúin og síðan lituð fyrir smásjárrannsókn, eða fest og lituð eins og við á fyrir flæðisgreiningu. Ef notaðir eru sérhæfðir DNA-litir (t.d. akridínappelsínugult (35. heimild) eða Hoechsts 33258 með pýróníni-Y (36. heimild)) má komast hjá sumum gervingum sem komið geta fram ef notaðir eru litir sem eru ekki sérhæfðir fyrir DNA. Þessi kostur útilokar ekki að notaðir séu aðrir hefðbundnir litir (t.d. Giemsa-litur til smásjárgreiningar). Jafnframt má nota aðrar aðferðir (t.d. sellulósasúlur til að fjarlægja kjörnóttar frumur (37. og 38. heimild), að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að þær samrýmist undirbúningi sýna á rannsóknarstofum.

Ef hægt er að nota þessar aðferðir má nota þráðhaldsmótefni (39. heimild), FISH-aðferð með þráðhaftsþreifara sem nær yfir allt þráðhaftið (40. heimild) eða staðbundna merkingu með sértækum þráðhaftsvísum sem nær yfir allt þráðhaftið, ásamt viðeigandi DNA andstæðulitun (41. heimild), til að greina einkenni smákjarna (litninga/litningabrot), til að ákvarða hvort gagnvirkið sem framkallar smákjarna sé vegna litningabrenglunar- og/eða mislitnunarvirkni. Nota má aðrar aðferðir til að greina á milli efna sem valda litningabrenglun og efna sem valda mislitnun ef sýnt hefur verið fram á að þær séu árangursríkar.

Greining (handvirk og sjálfvirk)

Öll sýnisgler eða sýni til greiningar, þ.m.t. jákvæður og neikvæður samanburður, skulu kóðuð hvert um sig fyrir hvers konar greiningu og valin af handahófi svo að talningafólk, sem telur handvirkt, þekki ekki til meðferðaraðstæðna; slík kóðun er óþörf þegar sjálfvirk talningarkerfi eru notuð þar sem ekki er treyst á sjónræna skoðun og hlutdrægni stjórnanda getur ekki haft áhrif á þau. Hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum (óþroskuðum + þroskuðum) rauðkornum er ákvarðað fyrir hvert dýr með því að telja a.m.k. 500 rauðkorn í beinmergssýni og 2000 rauðkorn í sýni með útæðablóði (42. heimild). Meta skal a.m.k. 4000 óþroskuð rauðkorn fyrir hvert dýr til að finna hlutfall smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna (43. heimild). Ef rannsóknarsögulegur gagnagrunnur um neikvæðan samanburð sýnir að bakgrunnsmeðalgildi fyrir smákjörnótt, óþroskuð rauðkorn er < 0,1% á prófunarstofunni skal íhuga að telja viðbótarfrumur. Við greiningu sýna skal hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum í dýrum, sem hafa fengið meðferð, ekki vera undir 20% af hlutfalli samanburðar með burðarefni/leysi við talningu í smásjá og ekki undir u.þ.b. 5% af hlutfalli samanburðar með burðarefni/leysi við talningu CD71 + óþroskaðra rauðkorna með frumumælingaraðferðum (sjá 31. lið) (29. heimild). Sem dæmi má nefna, að því er varðar beinmergsgreiningu með talningu í smásjá, að ef samanburðarhlutfall óþroskaðra rauðkorna í beinmerg er 50% væru efri mörk eiturhrifa 10% óþroskuð rauðkorn.

Þar eð milta í rottum einangrar og eyðileggur smákjörnótt rauðkorn er æskilegt að takmarka greiningu á smákjörnóttum óþroskuðum rauðkornum við yngsta hlutann til að viðhalda miklum næmleika við greiningu á útæðablóði úr rottum. Þegar sjálfvirkar greiningaraðferðir eru notaðar er hægt að greina óþroskuðustu rauðkornin út frá miklu RNA-innihaldi þeirra eða miklu magni af viðtökum fyrir transferrin (CD71+) sem birtast á yfirborði þeirra (31. heimild). Beinn samanburður á ólíkum litunaraðferðum hefur þó sýnt að hægt er að fá fullnægjandi niðurstöður með mismunandi aðferðum, þ.m.t. hefðbundin litun með akridínappelsínugulum (3. og 4. heimild).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Fyrir hvert dýr sem greining er gerð á skal skrá aðskilið fjölda óþroskaðra rauðkorna sem er talinn, fjölda smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna og hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum. Ef mýs eru í stöðugri meðferð í fjórar vikur eða lengur skal einnig leggja fram gögn um fjölda og hlutfall smákjörnóttra þroskaðra rauðkorna, hafi slíkra gagna verið aflað. Einnig skal greina frá gögnum um eiturhrif á dýr og klínísk einkenni.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Eftirfarandi viðmiðanir ákvarða ásættanleika prófunarinnar:

a) Gögnin um samskeiða neikvæðan samanburð eru talin ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar (sjá 15.–18. lið).

b) Samskeiða jákvæðir samanburðir eða samanburðir vegna talningar skulu vekja svaranir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum um jákvæðan samanburð og valda tölfræðilega marktækri aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn (sjá 24.–25. lið).

c) Viðeigandi fjöldi skammta og frumna hefur verið greindur.

d) Viðmiðanir fyrir vali á hæsta skammti eru í samræmi við það sem lýst er í 30.–33. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:

a) að minnsta kosti einn meðferðarhópur sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í tíðni smákjörnóttra óþroskaðra rauðkorna í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) þessi aukning er skammtatengd a.m.k. á einum sýnatökutíma í mati með viðeigandi leitniprófun, og

c) einhver þessara niðurstaðna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson).

Ef einungis hæsti skammtur er rannsakaður á tilteknum sýnatökutíma telst prófunaríðefnið greinilega jákvætt ef það er tölfræðilega marktæk aukning í samanburði við samskeiða, neikvæða samanburðinn og niðurstöðurnar lenda utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson). Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má finna í 44.–47. heimild. Þegar greining á tengslum skammta og svörunar er framkvæmd skal greina a.m.k. þrjá meðhöndlaða skammtahópa. Í tölfræðilegum prófunum skal nota dýrið sem tilraunaeininguna. Jákvæðar niðurstöður í smákjarnaprófuninni benda til þess að prófunaríðefnið kalli fram myndun smákjarna sem orsakast af skemmd í litningum eða jafnskiptingarkerfum í rauðkornamæðrum prófunartegundarinnar. Hafi prófun verið gerð til að greina þráðhaft í smákjörnum er prófunaríðefni sem framkallar smákjarna sem innihalda þráðhaft (þráðhaft eða þráðhald, sem gefur til kynna fulla litningafækkun) merki um að prófunaríðefnið sé efni sem veldur mislitnun.

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð, ef:

a) enginn meðferðarhópur sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í tíðni smákjörnóttra óþroskaðra rauðkorna í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) það er engin skammtatengd aukning á neinum sýnatökutíma í mati með viðeigandi leitniprófun,

c) allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð, byggð á Poisson) og

d) beinmergur hefur komist í snertingu við prófunaríðefni.

Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má finna í 44.–47. heimild. Merki um að beinmergur hafi komist í snertingu við prófunaríðefni geta m.a. komið fram í minnkun á hlutfalli milli óþroskaðra og þroskaðra rauðkorna eða í mælingu á blóðvökva eða blóði m.t.t. styrks prófunaríðefnisins eða -íðefnanna. Ef um er að ræða inngjöf í bláæð er ekki þörf á að sýna fram á snertingu við prófunaríðefni. Að öðrum kosti má nota gögn um upptöku, dreifingu, efnaskipti og útskilnað, sem fást úr sjálfstæðri rannsókn þar sem notuð er sama íkomuleið og sama tegund, til að sýna fram á að beinmergur hafi komist í snertingu við prófunaríðefni. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunaríðefnið ekki fram myndun smákjarna í óþroskuðum rauðkornum prófunartegundarinnar.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða skýrri neikvæðri svörun.

Í tilvikum þar sem svörunin er ekki greinilega neikvæð eða greinilega jákvæð og til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu (t.d. væg eða óviss aukning) skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar á þeim tilraunum sem er lokið. Í sumum tilvikum getur verið gagnlegt að greina fleiri frumur eða gera endurtekna tilraun með breyttum tilraunaskilyrðum.

Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um að prófunaríðefnið framkalli annaðhvort jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að rannsóknin sé tvíræð.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Samantekt

Prófunaríðefni:

— uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur.

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Tilreiðsla prófunaríðefnis:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum/burðarefninu, ef þau liggja fyrir

— tilreiðsla blandna í fóður, drykkjarvatn eða til innöndunar,

— magngreiningar á samsetningum (t.d. stöðugleiki, einsleitni, nafnstyrkur), fari þær fram.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð og rökstuðningur fyrir notkun,

— fjöldi, aldur og kyn dýra,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— aðferð til að auðkenna dýrin hvert um sig,

— að því er varðar skammtímarannsóknir: þyngd hvers dýrs við upphaf og lok prófunar; að því er varðar rannsóknir sem standa lengur en eina viku: líkamsþyngd hvers dýrs meðan rannsókn stendur yfir og fóðurát. Hafa skal með dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— gögn um jákvæðan og neikvæðan samanburð (burðarefni/leysir),

— gögn úr skammtastærðarrannsókn hafi hún verið gerð,

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— upplýsingar um tilreiðslu prófunaríðefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— rök fyrir íkomuleið og hve lengi gjöfin stendur yfir,

— aðferðir til að sannreyna að prófunaríðefnið eða -íðefnin hafi náð út í almennu blóðrásina eða markvefinn,

— raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar/dag) reiknuð út frá styrkleika prófunaríðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni og út frá neyslu, ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— aðferð við aflífun,

— aðferð við verkjastillingu (ef notuð),

— nákvæm lýsing á meðferð og sýnatökuáætlunum og rökstuðningur fyrir valinu,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— verklag við einangrun og varðveislu sýna,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— viðmiðanir fyrir mat á smákjörnóttum, óþroskuðum rauðkornum,

— fjöldi greindra frumna úr hverju dýri til að ákvarða tíðni smákjörnóttra óþroskaðra rauðkorna og til að ákvarða hlutfall óþroskaðra og þroskaðra rauðkorna,

— viðmiðanir fyrir ásættanleika rannsóknarinnar,

— aðferðir, s.s. notkun þráðhaldsmótefna eða þráðhaftssértækra þreifara, til að ákvarða hvort smákjarnar innihalda heila eða brotna litninga, ef við á.

Niðurstöður:

— ástand dýranna fyrir prófunina og á meðan henni stendur, þ.m.t. merki um eiturhrif,

— hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum,

— fjöldi smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna, tilgreindur aðskilið fyrir hvert dýr,

— meðaltal ± staðalfrávik smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna fyrir hvern hóp,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar,

— gögn um samskeiða, neikvæðan og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum, staðalfrávikum og 95% stýrimörkum dreifingar sem og tímabili, sem tekið var til, og fjölda gagnapunkta,

— gögn sem sýna fram á að beinmergur hafi komist í snertingu við prófunaríðefni,

— gögn um lýsingu á eiginleikum sem gefur til kynna hvort smákjarnar innihalda heila eða brotna litninga, ef við á,

— viðmiðanir sem eru uppfylltar fyrir jákvæða eða neikvæða svörun.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Ályktun.

Tilvísanir.

HEIMILDIR:

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

12) Mavournin, K.H. et al. (1990), The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

16) Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

21) Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test--study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

22) Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

24) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

25) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

26) Hayashi, M. et al. (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

27) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/– 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

31) Hayashi, M. et al. (2000), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

34) Spencer, P.J. et al. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

43) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

44) Richold, M. et al. (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

45) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays", in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

46) Hayashi, M. et al. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.'

———

1. viðbætir.

SKILGREININGAR

Þráðhaft: svæði á litningi þar sem spóluþræðir festast meðan á frumuskiptingu stendur og það gerir dótturlitningunum kleift að færast skipulega að skautum dótturfrumnanna.

Íðefni: efni eða blanda.

Rauðkornamóðir: snemmstig þroskunar rauðkorna, strax áður en óþroskuð rauðkorn myndast, þegar fruman inniheldur ennþá kjarna.

Þráðhald: prótínhluti sem myndast á þráðhafti heilkjarnafrumna og tengir litninginn við fjölliður örpíplanna í spólunni við jafn- og rýriskiptingu og sem dregur systurlitningsþræðina sundur í frumuskiptingum.

Smákjarnar: smágerðir kjarnar, sem eru aðskildir frá og til viðbótar við meginkjarna frumnanna, sem verða til í lokafasa jafnskiptingar (rýriskiptingar) út frá eftirliggjandi litningabrotum eða heilum litningum.

Hóflituð eða þroskuð rauðkorn: fullþroskuð rauðkorn sem hafa misst þær RNA-leifar sem verða eftir að lokinni kjarnasviptingu og/eða hafa misst önnur skammlíf frumumörk sem hverfa yfirleitt að lokinni kjarnasviptingu eftir lokaskiptingu rauðkornamóður.

Fjöllita eða óþroskuð rauðkorn: Nýmynduð rauðkorn á millistigi í þroskun, sem litast með bæði bláum og rauðum þáttum dæmigerðra blóðlita, s.s. Giemsa frá Wright, vegna þess að RNA-leifar eru í nýmynduðu frumunum Slíkar nýmyndaðar frumur eru u.þ.b. eins og netfrumur, sem eru gerðar sýnilegar með því að nota líflit sem veldur því að RNA-leifarnar hlaupa í kekki og mynda net. Oft eru notaðar aðrar aðferðir til að greina nýmynduð rauðkorn, þ.m.t. einlitun RNA með flúrlitum eða merkingu skammlífra yfirborðsmarka s.s. CD71 með flúrskinsmótefnum. Fjöllita rauðkorn, netfrumur og CD71-jákvæð rauðkorn eru öll óþroskuð rauðkorn en hafa að einhverju leyti ólíka aldursdreifingu.

Netfrumur: Nýmynduð rauðkorn lituð með líflit sem veldur því að RNA-frumuleifar hlaupa í kekki í einkennandi net. Netfrumur og fjöllita rauðkorn eru með svipaða aldursdreifingu frumna.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

———

2. viðbætir.

ÞÁTTBUNDIN TILHÖGUN TIL AÐ GREINA KYNJAMISMUN Í RANNSÓKNUM Í LÍFI Á SMÁKJÖRNUM

Þáttbundin tilhögun og greining hennar

Í þessari tilhögun eru a.m.k. 5 karldýr og 5 kvendýr prófuð við hvern styrk sem leiðir til þess að í þessari tilhögun eru notuð a.m.k. 40 dýr (20 karldýr og 20 kvendýr, ásamt viðeigandi jákvæðum samanburði).

Tilhögunin, sem er með einfaldari þáttbundnum tilhögunum, er jafngild tvíhliða dreifnigreiningu þar sem kyn og styrkgildi eru aðaláhrifin. Hægt er að greina gögnin með því að nota margs konar, staðlaða tölfræðihugbúnaðarpakka s.s. SPSS, SAS, STATA og Genstat ásamt því að nota R.

Greiningin skiptir breytileikanum í gagnamenginu milli kynja, styrkleika og verkunar milli kynjanna og styrkleikanna. Hver skilyrði eru prófuð með samanburði við áætlun fyrir breytileikann milli samanburðardýranna innan dýrahópa af sama kyni sem fá sama styrk. Allar upplýsingar um undirliggjandi aðferðafræði eru aðgengilegar í mörgum stöðluðum tölfræðikennslubókum (sjá tilvísanir) og í hjálparbúnaðinum sem fylgir tölfræðipökkunum.

Greiningunni er haldið áfram með því að skoða verkun kyns x styrks í dreifnigreiningartöflunni (ANOVA) ([1]). Sé marktæk verkun ekki til staðar gefa samanlögð gildi fyrir bæði kyn eða öll styrkleikastig gildar tölfræðilegar prófanir milli gilda sem grundvallast á samanlögðum breytileika innan hóps samkvæmt dreifnigreiningunni.

Greiningunni er haldið áfram með því að skipta áætluðum breytileika milli styrkleika í samanburðarföll sem gera það kleift að prófa fyrir línulegum samanburðarföllum og annars stigs samanburðarföllum í svörunum fyrir öll styrkleikastig. Ef marktæk verkun er til staðar milli kyns x styrks er einnig hægt að skipta þessari verkun í línuleg samanburðarföll x kyn og annars stigs samanburðarföll x kyn. Með þessu er hægt að prófa hvort styrksvörunin sé samsvarandi fyrir bæði kynin eða hvort það sé munur á svörun milli kynjanna.

Hægt er að nota áætlaðan, samanlagðan breytileika innan hóps til að gera paraðar prófanir á mismuninum milli meðaltalsins. Hægt er að gera þennan samanburð milli meðaltals fyrir bæði kynin og milli meðaltals fyrir mismunandi styrkleikastig, s.s. fyrir samanburð við neikvæð samanburðargildi. Í þeim tilvikum þar sem er marktæk virkni er hægt að gera samanburð á meðaltali mismunandi styrkleika fyrir sama kyn eða á meðaltali fyrir bæði kynin við sama styrk.

Tilvísanir

Fjallað er um kenninguna, tilhögunina, aðferðafræðina, greininguna og túlkunina á þáttbundnum tilhögunum í mörgum tölfræðikennslubókum, allt frá einföldustu tveggja þátta greiningu til flóknari forma sem eru notuð í aðferðafræði við tilhögun tilrauna. Eftirfarandi listi er ekki tæmandi. Í sumum bókum eru útreiknuð dæmi sambærilegrar tilhögunar, í sumum tilvikum með kóða til að keyra greininguna með aðstoð ýmissa hugbúnaðarpakka.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

([1]) Tölfræðingar sem velja líkansaðferðir, s.s. almenn línuleg líkön (e. *General Linear Models* (GLM)), geta notað aðra en sambærilega aðferð við greininguna en þurfa þó ekki endilega að leiða út hefðbundna dreifnigreiningartöflu sem byggir á algrímskri aðferð (e. *algorithmic approach*) til að reikna út tölfræðilegar upplýsingar áður en tölvur komu til sögunnar.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

6) Í B-hluta falli kafli B.15 brott.

7) Í B-hluta falli kafli B.16 brott.

8) Í B-hluta falli kafli B.18 brott.

9) Í B-hluta falli kafli B.19 brott.

10) Í B-hluta falli kafli B.20 brott.

11) Í B-hluta falli kafli B.24 brott.

12) Í stað kafla B.47 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.47 **BCOP-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á ógagnsæi og gegndræpi glæru úr nautgrip) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 437 um prófanir (2013). Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) mat BCOP-prófunaraðferðina ásamt Evrópumiðstöðinni um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) og Japansmiðstöðinni um fullgildingu staðgönguaðferða (JaCVAM) á árunum 2006 og 2010 (1. og 2. heimild). Í fyrra matinu var BCOP-prófunaraðferðin metin út frá gagnsemi við að greina íðefni (efni og blöndur) sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. heimild). Í seinna matinu var BCOP-prófunaraðferðin metin út frá gagnsemi við að greina íðefni (efni og blöndur) sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (2. heimild). Í BCOP-fullgildingargagnagrunninum voru í heild 113 efni og 100 blöndur (2. og 3. heimild). Samkvæmt þessum mötum og ritrýni á þeim var dregin sú ályktun að með prófunaraðferðinni væri hægt að greina á réttan hátt íðefni (bæði efni og blöndur) sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur) sem og þau sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (4. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna ([1]) og því fallist á að hún sé vísindalega gild í þeim tilgangi. Alvarlegur augnskaði eru vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á framflöt augans, sem gengur ekki algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á. Prófunaríðefni sem kalla fram augnskaða flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ. Íðefni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða eru skilgreind sem efni sem uppfylla ekki kröfurnar varðandi flokkun í 1. eða 2. undirflokk HSK SÞ (2A eða 2B), þ.e. vísað til þeirra sem utan flokka í HSK SÞ. Þessi prófunaraðferð nær yfir ráðlagða notkun og takmarkanir BCOP-prófunaraðferðarinnar sem byggja á tilheyrandi mati. Meginmunurinn á upprunalegu útgáfunni frá 2009 og uppfærðu útgáfunni frá 2013 á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðar, en er ekki takmarkaður við: notkun BCOP-prófunaraðferðarinnar til að greina íðefni sem þurfa ekki flokkun samkvæmt HSK SÞ (2. og 7. liður); nánari útlistun á hvort notkunarsvið BCOP-prófunaraðferðarinnar nær yfir prófun á alkóhóli, ketóni og föstum efnum (6. og 7. liður) og á efnum og blöndum (8. liður); nánari útlistun á hvernig prófa ætti yfirborðsvirk efni og blöndur sem innihalda yfirborðsvirk efni (28. liður); uppfærslur og nánari útlistun varðandi jákvæðan samanburð (39. og 40. liður); uppfærslu á viðmiðunum fyrir ákvörðun á notkun BCOP-prófunaraðferðarinnar (47. liður); uppfærslu á viðmiðunum fyrir samþykkt rannsóknar (48. liður); uppfærslu á þáttum í prófunarskýrslunni (49. liður); uppfærslu á 1. viðbæti varðandi skilgreiningar; viðbót 2. viðbætis varðandi forspárgildi BCOP-prófunaraðferðarinnar samkvæmt mismunandi flokkunarkerfum; uppfærslu á 3. viðauka varðandi skrána yfir hæfnisíðefni; og uppfærslu á 4. viðbæti varðandi glæruhaldara fyrir BCOP-prófunaraðferðina (1. liður) og ljósdeyfnimælinn (2. og 3. liður).

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

Nú er almennt viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin augnertingarprófun í glasi komið í stað Draize-augnprófunarinnar í lífi til að spá fyrir um allar tegundir ertinga fyrir mismunandi íðefnaflokka. Stefnumiðaðar samsetningar nokkurra staðgönguprófunaraðferða innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar gætu þó komið í stað Draize-augnprófunarinnar (5. heimild). Ofansækin nálgun (5. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni hafi mikinn ertingarmátt en neðansækin nálgun (5. heimild) er hönnuð til að nota þegar ekki er búist við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni valdi nægilegri augnertingu til að þörf sé á flokkun. BCOP-prófunaraðferðin er aðferð til prófunar í glasi sem er hægt að nota, við tilteknar aðstæður og með sértækum takmörkunum, til flokkunar og merkingar á íðefnum sem eru hættuleg fyrir augu. Þótt BCOP-prófunaraðferðin sé ekki talin gild sem sjálfstæður valkostur í stað augnprófunar í lífi á kanínum er hún ráðlögð sem upphafsstig innan prófunaráætlunar, s.s. ofansækinnar nálgunar eins og fram kemur í Scott et al. (5. heimild), til að greina íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða, þ.e. íðefni sem skulu flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ, án frekari prófana (4. heimild). Einnig er mælt með BCOP-prófunaraðferðinni til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða, eins og skilgreint er í HSK SÞ (utan flokka í HSK SÞ) (4. heimild), innan prófunaráætlunar s.s. neðansækinnar nálgunar (5. heimild). Íðefni sem ekki er spáð að valdi alvarlegum augnskaða eða er ekki flokkað sem augnertandi/valdi alvarlegum augnskaða með BCOP-prófunaraðferðinni þarf þó viðbótarprófun (í glasi og/eða í lífi) til að ákveða endanlega flokkun.

Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðunum sem eru notaðar til að meta möguleikann á að prófunaríðefnið sé hættulegt fyrir augu með mælingu á getu þess til að kalla fram ógagnsæi og aukið gegndræpi í einangraðri glæru úr nautgrip. Eiturhrif á glæruna eru mæld með: i) skertri gegnumferð ljóss (ógagnsæi) og ii) aukinni gegnumferð natríumflúrskinslitar (gegndræpi). Mat á ógagnsæi og mat á gegndræpi glærunnar eftir váhrif frá prófunaríðefni eru sameinuð til að fá fram ertingarstig *í glasi* (IVIS) sem eru notuð til að flokka ertingarstig prófunaríðefnisins.

Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

Þessi prófunaraðferð er byggð á aðferðarlýsingu ICCVAM-nefndarinnar fyrir BCOP-prófunaraðferðina (6. og 7. heimild) sem var upphaflega þróuð út frá upplýsingum sem fengnar eru úr aðferðarlýsingu Stofnunarinnar um rannsóknir í glasi (IIVS) og 124. aðferðarlýsingu INVITTOX (8. heimild). Sú síðari er aðferðarlýsingin sem notuð var í forfullgildingarrannsókninni sem Evrópubandalagið styrkti og var gerð 1997–1998. Báðar þessar aðferðarlýsingar voru byggðar á BCOP-prófunaraðferðinni sem Gautheron et al. voru fyrstir til að lýsa (9. heimild).

BCOP-prófunaraðferðina er hægt að nota til að greina íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða eins og skilgreint er í HSK SÞ, þ.e. íðefni sem skulu flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ (4. heimild). Þegar BCOP-prófunaraðferðin er notuð í þessum tilgangi er heildarnákvæmni hennar 79% (150/191), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna er 25% (32/126) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna er 14% (9/65) þegar aðferðin er borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð í lífi sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ (3. heimild) (sjá töflu 1 í 2. viðbæti). Þegar prófunaríðefni í

tilteknum efnaflokkum (þ.e. alkóhól, ketón) eða eðlisfræðilegum flokkum (þ.e. föst efni) eru ekki höfð í gagnasafninu er heildarnákvæmni BCOP-prófunaraðferðarinnar 85% (111/131), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna er 20% (16/81) og falsneikvæðra niðurstaðna er 8% (4/50) fyrir flokkunarkerfi HSK SÞ (3. heimild). Mögulegir annmarkar BCOP-prófunaraðferðarinnar, þegar hún er notuð til að greina íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ), byggjast á háu hlutfalli falsjákvæðra niðurstaðna fyrir alkóhól og ketón og háu hlutfalli falsneikvæðra niðurstaðna fyrir föst efni, sem eru skráð í fullgildingargagnabankann (1.–3. heimild). Þar eð BCOP-prófunaraðferðin ofmetur ekki öll alkóhól og ketón og prófunin spáir rétt fyrir um að sum þeirra séu í 1. undirflokki HSK SÞ, teljast þessir tveir hópar virkra lífrænna efna ekki falla utan notkunarsviðs prófunaraðferðarinnar. Það er undir notanda prófunaraðferðarinnar komið að ákveða hvort mögulegt ofmat á alkóhóli eða ketóni sé ásættanlegt eða hvort gera ætti frekari prófanir með nálgun með vægi rökstuddra vísbendinga. Að því er varðar falsneikvæðar niðurstöður fyrir föst efni ætti að hafa í huga að föst efni geta leitt til breytilegra og mikilla váhrifaaðstæðna við Draize-augnertingarprófun í glasi sem gæti leitt til spáa sem eiga ekki við um raunverulegan ertingarmátt þeirra (10. heimild). Einnig ætti að hafa í huga að engin falsneikvæðu niðurstaðnanna í ICCVAM-fullgildingargagnagrunninum (2. og 3. heimild), í tengslum við greiningu á íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ), leiddi af sér IVIS ≤ 3 sem er viðmiðunin sem notuð er til að greina prófunaríðefni sem utan flokka í HSK SÞ. Ennfremur eru falsneikvæðar niðurstöður BCOP-prófunaraðferðarinnar í þessu samhengi ekki mikilvægar þar sem öll prófunaríðefni sem leiða af sér 3 < IVIS ≤ 55 myndu því næst verða prófuð með öðrum fullnægjandi fullgiltum prófunum í glasi eða, sem síðasta valkost, á kanínum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga. Í ljósi þess að BCOP-prófunaraðferðin spáir rétt fyrir um sum föst íðefni, að þau séu í 1. undirflokki HSK SÞ, telst það eðlisástand ekki heldur vera utan notkunarsviðs prófunaraðferðarinnar. Rannsakendur geta íhugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir allar gerðir íðefna og þá skal IVIS > 55 samþykkt sem vísbending um svörun sem kallar fram alvarlegan augnskaða sem ætti að flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ án frekari prófana. Eins og áður var getið skal þó túlka jákvæðar niðurstöður, sem eru fengnar með alkóhólum eða ketónum, með varúð vegna möguleikans á ofmati.

BCOP-prófunaraðferðina er einnig hægt að nota til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ (4. heimild). Þegar BCOP-prófunaraðferðin er notuð í þessum tilgangi er heildarnákvæmni hennar 69% (135/196), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna er 69% (61/89) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna er 0% (0/107) þegar aðferðin er borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð í lífi sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ (3. heimild) (sjá töflu 2 í 2. viðbæti). Falsjákvæðu niðurstöðurnar sem fást (í lífi, utanflokkaíðefni samkvæmt HSK SÞ sem leiða af sér IVIS > 3, sjá 47. lið) teljast verulega háar en ekki mikilvægar í þessu samhengi þar sem öll prófunaríðefni sem leiða af sér 3 < IVIS ≤ 55 myndu því næst verða prófuð með öðrum fullnægjandi fullgiltum prófunum í glasi eða, sem síðasta valkost, á kanínum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga. Engir tilteknir annmarkar eru á BCOP-prófunaraðferðinni varðandi próf un á alkóhólum, ketónum og föstum efnum þegar tilgangurinn er að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokka í HSK SÞ) (3. heimild). Rannsakendur geta íhugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir allar gerðir íðefna og þá skal neikvæð niðurstaða (IVIS ≤ 3) samþykkt sem vísbending um að ekki sé þörf fyrir flokkun (utan flokks í HSK SÞ). Þar eð BCOP-prófunaraðferðin getur aðeins greint á réttan hátt 31% íðefnanna sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða ætti þessi prófunaraðferð ekki að vera fyrsta val til að hefja neðansækna nálgun (5. heimild) ef aðrar fullgildar og viðurkenndar aðferðir í glasi með sambærilegt næmi, en meira sértæki, eru tiltækar.

Í BCOP-fullgildingargagnagrunninum voru í heild 113 efni og 100 blöndur (2. og 3. heimild). BCOP-prófunaraðferðin telst því viðeigandi til prófunar á bæði efnum og blöndum.

Ekki er mælt með BCOP-prófunaraðferðinni til greiningar á prófunaríðefnum sem ætti að flokka sem augnertandi (2. undirflokkur HSK SÞ eða undirflokkur 2A) eða prófunaríðefni sem ætti að flokka sem lítið augnertandi (HSK SÞ, undirflokkur 2B) vegna þess mikla fjölda íðefna í 1. undirflokki HSK SÞ sem eru undirflokkuð í 2. undirflokk HSK SÞ og undirflokka 2A eða 2B og íðefna utan flokka í HSK SÞ sem eru yfirflokkuð í 2. undirflokk HSK SÞ og undirflokka 2A eða 2B (2. og 3. heimild). Í þessum tilgangi getur verið nauðsynlegt að gera frekari prófanir með annarri hentugri aðferð.

Allar aðferðir, þar sem notuð eru augu úr nautgripum og glærur úr nautgripum, skulu fylgja gildandi reglum og verklagi prófunarstöðvarinnar fyrir meðhöndlun á efnum sem eru unnin úr dýrum, þ.m.t., en ekki takmarkað við, vefjum og vefjavökvum. Mælst er til að notaðar séu alþjóðlegar varúðarráðstafanir fyrir rannsóknarstofur (11. heimild).

Þó að BCOP-prófunaraðferðin taki ekki til táru- eða lituskaða þá tekur hún á áhrifum á glæru sem eru mikilvægasti þátturinn í *í lífi*-flokkun með tilliti til flokkunar samkvæmt HSK SÞ. Ekki er hægt að meta með BCOP-prófunaraðferðinni sem slíkri hvort vefjaskemmdir í augum gangi til baka. Lagt hefur verið til, á grundvelli rannsókna á kanínuaugum, að nota megi mat á upphafsdýpt glæruskaða til að greina sumar gerðir varanlegra áhrifa (12. heimild). Þó er þörf á frekari vísindaþekkingu til að skilja hvernig varanleg áhrif, sem tengjast ekki upphaflega alvarlega skaðanum, verða til. Að lokum gefur BCOP-prófunaraðferðin ekki færi á mati á möguleikanum á altækum eiturhrifum sem tengjast váhrifum á augu.

Þessi prófunaraðferð verður uppfærð reglulega eftir því sem nýjar upplýsingar og gögn eru tekin til athugunar. Vefjameinafræði getur t.d. hugsanlega verið gagnleg þegar þörf er á fyllri lýsingu á skemmdum á glæru. Eins og lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 160 (13. heimild) eru notendur hvattir til að varðveita glærur og undirbúa sýni til vefjameinafræðilegarar athugunar sem hægt er að nota til að þróa gagnagrunn og viðmiðanir fyrir ákvarðanir sem geta aukið enn frekar nákvæmni þessarar prófunaraðferðar.

Sérhver rannsóknarstofa sem byrjar að nota þessa prófunaraðferð skal nota hæfnisíðefnin sem kveðið er á um í 3. viðbæti. Rannsóknarstofu er heimilt að nota þessi íðefni til að sýna fram á tæknilega færni sína við beitingu BCOP-prófunaraðferðarinnar áður en hún leggur inn gögn, fengin með BCOP-prófunaraðferðinni, vegna lögbundinnar flokkunar í hættuflokka.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

BCOP-prófunaraðferðin er líffærislíkan *í glasi* sem viðheldur í stuttan tíma eðlilegri lífeðlisfræðilegri og lífefnafræðilegri virkni glæru úr nautgrip. Með þessari prófunaraðferð eru skemmdir af völdum prófunaríðefnisins metnar með megindlegum mælingum á breytingum á ógagnsæi og gegndræpi glærunnar með ljósdeyfnimæli og litrófsmæli fyrir sýnilegt ljós eftir því sem við á. Báðar mælingarnar eru notaðar til að reikna út ertingarstig *í glasi* sem eru notuð við *í glasi*-flokkun í hættuundirflokk fyrir ertingu til að spá fyrir um augnertingarmátt prófunaríðefnis í lífi (sjá „Viðmiðanir fyrir ákvarðanir“ í 48. lið).

Í BCOP-prófunaraðferðinni eru notaðar einangraðar glærur úr augum nýslátraðra nautgripa. Ógagnsæi glæru er mælt megindlega sem það magn ljóss sem fer í gegnum hana. Gegndræpi er mælt megindlega sem það magn natríumflúrskinslitar sem fer gegnum alla þykkt glærunnar og mælist í ætinu í aftara hólfinu. Prófunaríðefni eru borin á yfirborð glæruþekjunnar með því að bæta því í fremra hólf glæruhaldarans. Í 4. viðbæti er lýsing á glæruhaldara, sem er notaður í BCOP-prófunaraðferðinni, og skýringarmynd af honum. Hægt er að kaupa glæruhaldara frá mismunandi aðilum eða smíða hann.

Uppruni og aldur augna úr nautgripum og val á dýrategundum

Nautgripum, sem eru sendir í sláturhús, er oftast slátrað til manneldis eða annarra nota í viðskiptalegum tilgangi. Uppruni glæra, sem eru notaðar í BCOP-prófunaraðferðinni, er eingöngu heilbrigð dýr sem eru talin hæf til að fara inn í matvælaferlið. Þar eð þyngd nautgripa liggur á breiðu bili og fer eftir búfjárkyni, aldri og kyni er ekki ráðlögð ákveðin þyngd á dýrinu við slátrun.

Ef notuð eru augu úr misgömlum dýrum getur það haft í för með sér breytileika í stærðarmáli glæra. Glærur, sem eru > 30,5 mm að láréttu þvermáli og ≥ 100 μm að þykkt í miðri glæru, fást yfirleitt úr nautgripum sem eru eldri en 8 ára en glærur, sem eru < 28,5 mm að láréttu þvermáli og < 900 μm að þykkt í miðri glæru, fást yfirleitt úr nautgripum sem hafa ekki náð 5 ára aldri (14. heimild). Af þessum sökum eru að jafnaði ekki notuð augu úr nautgripum sem eru eldri en 60 mánaða. Ekki er venja að nota augu úr gripum sem hafa ekki náð 12 mánaða aldri þar eð augun eru þá enn að þroskast og þykkt og þvermál glærunnar umtalsvert minna en gefið er upp fyrir fullorðna nautgripi. Þó er leyfilegt að nota glæru úr ungum dýrum (þ.e. 6–12 mánaða) þar eð henni fylgja nokkrir kostir, s.s. aukið framboð, þröngt aldursbil og minni hætta á hugsanlegum kúariðuváhrifum á starfsfólk (15. heimild). Þar eð gagnlegt væri að meta betur áhrif stærðar eða þykktar glæru á svörun við ætandi og ertandi íðefnum eru notendur hvattir til að gefa upp áætlaðan aldur og/eða þyngd dýranna sem glærurnar, sem eru notaðar í rannsókn, eru teknar úr.

Söfnun og flutningur augna til rannsóknarstofunnar

Starfsfólk sláturhúsa tekur augun. Til að lágmarka aflrænan skaða og annan skaða á augum skulu þau numin brott eins fljótt og hægt er eftir dauða dýrsins og kæld strax og á meðan flutningi stendur. Til að koma í veg fyrir að augun komist í snertingu við íðefni sem eru hugsanlega ertandi skal starfsfólk sláturhússins ekki nota þvotta- og hreinsiefni við skolun á höfði dýrsins.

Augun skulu lögð í kælda jafnaða saltlausn samkvæmt Hank (HBSS) í hæfilega stóru íláti, svo að fljóti alveg yfir þau, og flutt á rannsóknarstofuna á þann hátt að skemmdir og/eða bakteríusmit verði í lágmarki. Þar eð augun eru tekin meðan á slátrun stendur geta þau komist í snertingu við blóð og önnur líffræðileg efni, þ.m.t. bakteríur og aðrar örverur. Það er því mikilvægt að tryggja að áhætta á mengun sé í lágmarki (t.d. með því að geyma ílátið með augunum á blautum ís við söfnun og flutning og með því að bæta sýkladrepandi efnum í saltlausnina (HBSS) sem augun eru geymd í meðan á flutningi stendur, t.d. penisillíni í styrknum 100 IU/ml og streptómýsíni í styrknum 100 μg/ml).

Tímabilið milli töku augnanna og notkunar glæranna samkvæmt BCOP-prófunaraðferðinni ætti að vera sem styst (að jafnaði skulu þau notuð sama dag og þau eru tekin) og skal sýnt fram á að lengd þess spilli ekki niðurstöðum greiningarinnar. Þær niðurstöður eru byggðar á valviðmiðunum fyrir augun, sem og jákvæðum og neikvæðum svörunum úr samanburðarprófunum. Öll augu, sem eru notuð í greiningunni, skulu vera úr sama samsafni augna, teknu á tilgreindum degi.

Valviðmiðanir fyrir augu sem eru notuð í BCOP-prófunaraðferðinni

Þegar komið er með augun á rannsóknarstofuna skal skoða vandlega hvort á þeim eru gallar, þ.m.t. ógagnsæi, rispur og nýæðun. Aðeins skal nota glærur úr augum sem eru laus við slíka galla.

Gæði hverrar glæru eru einnig metin á síðari stigum greiningarinnar. Eftir einnar klukkustundar jafnvægisstillingu skal farga glærum sem eru ógagnsærri en sem nemur sjö ógagnsæieiningum eða jafngildi þess fyrir ljósdeyfnimælinn og glæruhaldarana sem voru notaðir (ATH.: ljósdeyfnimælirinn skal vera kvarðaður við ógagnsæisstaðla sem eru notaðir til að ákvarða ógagnsæieiningarnar, sjá 4. viðbæti).

Hver meðferðarhópur (prófunaríðefni og samskeiða jákvæður og neikvæður samanburður) samanstendur af minnst þremur augum. Nota skal þrjár glærur sem neikvæðar samanburðarglærur í BCOP-prófunaraðferðinni. Þar eð allar glærur eru skornar brott úr heilu auga og komið fyrir í glæruhólfunum er hugsanlegt að skemmd eftir meðhöndlun hafi áhrif á ógagnsæis- og gegndræpisgildi hverrar glæru (að neikvæða samanburðinum meðtöldum). Auk þess eru ógagnsæis- og gegndræpisgildi neikvæðu samanburðarglæranna notuð til að leiðrétta ógagnsæis- og gegndræpisgildi glæranna, sem eru meðhöndlaðar með prófunaríðefni, og jákvæða samanburðarins við útreikning á ertingarstigi í glasi.

VERKFERLI

Undirbúningur augnanna

Gallalausar glærur eru skornar úr með 2–3 mm brún af hvítunni áhangandi til að auðvelda meðhöndlunina, sem á eftir kemur, og þess gætt að skadda ekki glæruþekjuna og -innþekjuna. Einangruðum glærum er komið fyrir í sérhönnuðum glæruhöldurum sem samanstanda af fremri og aftari hólfum, það fremra með skilfleti við glæruþekjuna og það aftara við innþekju hennar. Bæði hólfin eru fyllt algerlega með forhituðu lágmarksæti Eagles (e. *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM)) án fenólrauðs litvísis (aftara hólfið á undan) og tryggt að ekki myndist neinar loftbólur. Búnaðurinn er síðan jafnvægisstilltur við 32 ± 1 °C í a. m. k. eina klukkustund til að glærurnar jafnvægisstillist við ætið og til að í þeim náist eðlileg efnaskiptavirkni, að því marki sem unnt er (hitastig yfirborðs glærunnar í lífi er u.þ.b. 32 °C).

Þegar jafnvægisstillingartímabilinu lýkur er nýju forhituðu EMEM-æti, án fenólrauðs, bætt í bæði hólfin og gerðar grunnviðmiðunarmælingar á ógagnsæi fyrir hverja glæru. Öllum glærum með stórsæjar vefjaskemmdir (t.d. rispur, litun, nýæðun) eða ógagnsæi sem er meira en sjö ógagnsæieiningar, eða jafngildi þess fyrir ljósdeyfnimælinn og glæruhaldarana sem eru notuð, er fargað. Minnst þrjár glærur eru valdar sem glærur í neikvæðan samanburð (eða samanburð með leysi). Þeim glærum, sem eftir eru, er þá skipt í meðferðarhópa og jákvæða samanburðarhópa.

Varmarými vatns er meiri en lofts og vatn veitir því stöðugri hitaskilyrði til að láta sýnið standa við. Því er mælt með því að nota vatnsbað til að halda glæruhaldaranum og innihaldi hans við 32 ± 1 °C. Þó ert hægt að nota lofthitakassa ef þess er gætt að viðhalda stöðugleika hitastigsins (t.d. með því að forhita haldarann og ætið).

Prófunaríðefnið borið á

Notaðar eru tvær mismunandi aðferðarlýsingar, önnur fyrir vökva og yfirborðsvirk efni (föst eða fljótandi) og hin fyrir óyfirborðsvirk efni.

Vökvar eru prófaðir óþynntir. Hálfföst efni, krem og vax eru oftast prófuð sem vökvar. Yfirborðsvirk efni á hreinu formi eru prófuð við styrkinn 10% (massi miðað við rúmmál) í 0,9% natríumklóríðlausn, eimuðu vatni eða öðrum leysi sem hefur verið sýnt fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið. Ef annar þynningarstyrkur er notaður skal það rökstutt. Blöndur sem innihalda yfirborðsvirk efni má prófa óþynntar eða þynntar í viðeigandi styrk með hliðsjón af viðkomandi sviðsmynd af váhrifum í lífi. Rökstyðja skal notkun þess styrks sem er prófaður. Glærurnar eru látnar verða fyrir váhrifum frá vökvum og yfirborðsvirkum efnum í 10 mínútur. Ef aðrir váhrifatímar eru notaðir skal það stutt fullnægjandi, vísindalegum rökum. Skilgreiningar á yfirborðsvirku efni og blöndum sem innihalda yfirborðsvirk efni er að finna í 1. viðbæti.

Óyfirborðsvirk, föst efni eru að jafnaði prófuð sem lausnir eða sviflausnir í 20% (massi miðað við rúmmál) styrk í 0,9% natríumklóríðlausn, eimuðu vatni eða öðrum leysi sem sýnt hefur verið fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið. Við ákveðnar aðstæður og með nægum vísindaleg rökum er einnig heimilt að prófa föst efni í hreinu formi með því að bera þau beint á yfirborð glærunnar með aðferðinni með opnu hólfi (sjá 32. lið) Glærur eru látnar verða fyrir váhrifum frá föstum efnum í fjórar klukkustundir en heimilt er, eins og með vökva og yfirborðsvirk efni, að nota aðra váhrifatíma ef það er stutt fullnægjandi vísindalegum rökum.

Hægt er að nota aðrar aðferðir við meðhöndlun prófunaríðefnisins sem fara eftir eðlisfræðilegum og efnafræðilegum eiginleikum þess (t.d. föst efni, vökvar, seigfljótandi vökvar eða vökvar sem eru ekki seigfljótandi). Mikilvægasti þátturinn er að tryggja að prófunaríðefnið þeki yfirborð þekjunnar nægilega vel og að það sé fjarlægt nægilega vel á skolunarstiginu. Að jafnaði er notuð aðferð með lokuðu hólfi fyrir prófunaríðefni sem eru ekki seigfljótandi eða lítið eitt seigfljótandi en aðferð með opnu hólfi fyrir prófunaríðefni sem eru hálfseigfljótandi og seigfljótandi og fyrir föst efni í hreinu formi.

Í aðferðinni með lokuðu hólfi er nóg af prófunaríðefni (750 µl) til að þekja þekjuhlið glærunnar sett í fremra hólfið gegnum skammtagötin ofan á hólfinu og þeim síðan lokað með hólfatöppunum meðan á váhrifum stendur. Það er mikilvægt að tryggja að hver glæra sé látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu í hæfilega langan tíma.

Í aðferðinni með opnu hólfi eru hringlaga þéttið og glerglugginn fjarlægð af fremra hólfinu fyrir meðhöndlunina. Samanburðar- eða prófunaríðefnið (750 µl, eða nóg af prófunaríðefni til að þekja glæruna alveg) er borið beint á yfirborð glæruþekjunnar með örpípettu. Ef erfitt er að pípla prófunaríðefni má setja prófunaríðefnið undir þrýstingi í ruðningspípettu til hagræðis við skömmtunina. Oddi ruðningspípettunnar er stungið inn í skömmtunarenda sprautunnar svo að hægt sé að setja efnið inn í ruðningspípettuna með þrýstingi. Um leið og pípettubullan er dregin upp er þrýst á bulluna í sprautunni. Ef loftbólur koma í ljós í oddi pípettunnar er prófunaríðefnið fjarlægt (því þrýst út) og ferlið endurtekið þar til oddurinn er fylltur og án lofbóla. Ef það er nauðsynlegt er hægt að nota venjulega sprautu (án nálar) þar eð hún gerir kleift að mæla nákvæmlega rúmmál prófunaríðefnisins og auðveldara verður að bera það á yfirborð glæruþekjunnar. Eftir skömmtunina er glugginn aftur settur á sinn stað á fremra hólfinu til að endurskapa lokað kerfi.

Viðstaða við prófunarskilyrði eftir váhrif

Eftir váhrifatímabilið er prófunaríðefnið, neikvæði samanburðurinn eða jákvæði samanburðurinn fjarlægður úr fremra hólfinu og þekjan þvegin minnst þrisvar sinnum (eða þar til ekki er hægt að sjá nein merki um prófunaríðefnið) með EMEM-æti (sem inniheldur fenólrauðan). Æti með fenólrauðum er notað til skolunar þar eð unnt er, með því að vakta breytingar á fenólrauða litvísinum, að ákvarða hversu vel tekst að skola burt súrum eða basískum íðefnum. Glærurnar eru þvegnar oftar en þrisvar sinnum ef fenólrauði er enn mislitur (gulur eða fjólublár) eða ef prófunaríðefnið er enn sýnilegt. Þegar ætið er laust við prófunaríðefni eru glærurnar skolaðar einu sinni að lokum með EMEM-æti (án fenólrauðs). EMEM-ætið (án fenólrauðs) er notað til lokaskolunar til að tryggja að fenólrauði hafi verið fjarlægður úr fremra hólfinu fyrir mælinguna á ógagnsæi. Þá er fremra hólfið fyllt aftur með nýju EMEM-æti án fenólrauðs.

Við prófun á vökvum eða yfirborðsvirkum efnum eru glærurnar látnar standa eftir skolun við 32 ± 1 °C í tvær klukkustundir til viðbótar. Við tilteknar aðstæður getur verið gagnlegt að lengja eftirváhrifatímann og er hægt að meta það í hverju tilviki fyrir sig. Glærur, sem eru meðhöndlaðar með föstum efnum, eru skolaðar vandlega við lok fjögurra klukkustunda váhrifatímans en þurfa ekki að standa lengur við prófunarskilyrði.

Við lok viðstöðunnar við prófunarskilyrði eftir váhrifatímann, þegar um er að ræða vökva og yfirborðsvirk efni, og við lok fjögurra tíma váhrifatímans, þegar um er að ræða óyfirborðsvirk, föst efni, eru ógagnsæi og gegndræpi hverrar glæru skráð. Auk þess er hver glæra athuguð sjónrænt og viðeigandi athugasemdir skráðar (t.d. flögnun vefja, leifar prófunaríðefnis, óeinsleit ógagnsæismynstur). Þessar athuganir geta verið mikilvægar þar eð þær kunna að endurspeglast í breytileika í ljósdeyfnimælingunum.

Samanburðaríðefni

Í hverri tilraun er samskeiða, neikvæður samanburður eða samanburður með leysi eða burðarefni, og jákvæður samanburður.

Þegar fljótandi efni er prófað óþynnt er samskeiða, neikvæður samanburður (t.d. 0,9% natríumklóríðlausn eða eimað vatn) hafður með í BCOP-prófunaraðferðinni til þess að hægt sé að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að gefa grunnviðmiðun fyrir endapunkta greiningarinnar. Það tryggir einnig að greiningarskilyrðin leiði ekki af sér ertingarsvörun sem á ekki við.

Þegar þynnt, fljótandi efni, yfirborðsvirkt efni eða fast efni er prófað er samskeiða samanburðarhópur með leysi eða burðarefni hafður með í BCOP-prófunaraðferðinni til þess að hægt sé að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að gefa grunnviðmiðun fyrir endapunkta greiningarinnar. Aðeins má nota leysi eða burðarefni sem sýnt hefur verið fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið.

Íðefni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun er haft með í hverri tilraun sem samskeiða, jákvæður samanburður til að sannreyna heilleika prófunarkerfisins og rétta framkvæmd. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal ertingarsvörunin þó ekki vera of kröftug.

Dæmi um jákvæða samanburði fyrir fljótandi prófunaríðefni eru 100% etanól eða 100% dímetýlformamíð. Dæmi um jákvæðan samanburð fyrir föst prófunaríðefni er 20% (massi miðað við rúmmál) imídasól í 0,9% natríumklóríðlausn.

Viðmiðunaríðefni eru gagnleg til að meta augnertingarmátt óþekktra íðefna í tilgreindum íðefna- eða vöruflokki eða til að meta hlutfallslegan ertingarmátt augnertandi efnis á tilteknu ertingarsvörunarsviði.

Endapunktar mældir

Ógagnsæi er ákvarðað út frá því magni ljóss sem fer í gegnum glæruna. Ógagnsæi glæru er mælt megindlega með ljósdeyfnimæli sem gefur ógagnsæisgildi, mæld á samfelldum kvarða.

Gegndræpi er ákvarðað með hliðsjón af magni natríumflúrskinslitar sem flæðir gegnum öll frumulög glærunnar (þ.e. þekjuna á ytra yfirborði glærunnar og gegnum innþekjuna á innra yfirborði hennar). 1 ml af natríumflúrskinslausn (4 eða 5 mg/ml, ef prófaðir eru, annars vegar, vökvar og yfirborðsvirk efni eða, hins vegar, föst efni sem eru ekki yfirborðsvirk) er bætt í fremra hólf glæruhaldarans, sem hefur skilflöt við þekjuhlið glærunnar, en fremra hólfið, sem hefur skilflöt við innþekjuhlið glærunnar, er fyllt af nýju EMEM-æti. Því næst er haldarinn látinn standa láréttur við prófunarskilyrði í 90 ± 5 mín. við 32 ± 1 °C. Magn natríumflúrskins, sem flæðir inn í aftara hólfið, er mælt megindlega með litrófsmælingu í útfjólublá og/eða sýnilegu ljósi. Litrófsmælingar, metnar við 490 nm, eru skráðar sem ljósþéttnigildi (OD_{490}) eða gleypnigildi sem eru mæld á samfelldum kvarða. Gegndræpisgildi flúrskinslausnarinnar eru ákvörðuð með því að nota OD_{490}-gildi sem eru byggð á litrófsmæli fyrir sýnilegt ljós með 1 cm staðlaða ljósmælilengd.

Einnig er hægt að nota lesara fyrir 96 hola örtítrunarbakka, að því tilskildu að i) hægt sé að fastsetja línulegt svið bakkalesarans við ákvörðun á OD_{490}-gildum flúrskinslausnar og ii) notað sé rétt rúmmál flúrskinslausnarsýna í 96 holu bakkanum svo að OD_{490}-gildin sem fást jafngildi 1 cm stöðluðu ljósmælilengdinni (til þess gæti þurft fleytifulla holu, oftast um 360 µl).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

Þegar búið er að leiðrétta ógagnsæisgildi og meðalgildi gegndræpis (OD_{490}) fyrir bakgrunnsógagnsæisgildi og OD_{490}-gegndræpisgildi neikvæða samanburðarins skal sameina meðalgildi ógagnsæis og meðalgildi OD_{490}-gegndræpis fyrir hvern meðferðarhóp í útleiddri reynsluformúlu til að reikna ertingarstig *í glasi* fyrir hvern meðferðarhóp sem hér segir:

Ertingarstig í glasi = meðalgildi ógagnsæis + (15 × meðalgildi OD_{490}-gegndræpis)

Sina *et al*. (16. heimild) skýrðu frá því að þessi formúla hefði verið leidd út meðan á innanhúss- og fjölsetrarannsóknum stóð. Gögn, sem fengin voru fram í rannsókn margra rannsóknarstofa á röð 36 efnasambanda, voru sett í fjölbreytugreiningu til að finna þá formúlu sem fellur best að bæði gögnunum í lífi og í glasi. Vísindamenn tveggja mismunandi fyrirtækja gerðu þessa greiningu og leiddu út nánast eins jöfnur.

Einnig skal meta ógagnsæis- og gegndræpisgildi óháð hvort öðru til að ákvarða hvort prófunaríðefni kallar fram ætingu eða mikla ertingu með aðeins öðrum af endapunktunum tveimur (sjá „Viðmiðanir fyrir ákvarðanir“).

Viðmiðanir fyrir ákvarðanir

Þröskuldsgildi ertingarstigs í glasi fyrir greiningu á prófunaríðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ) og prófunaríðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (utan flokka í HSK SÞ) eru gefin upp hér á eftir:

IVIS	HSK SÞ
≤ 3	Utan flokka
> 3, ≤ 55	Ekki er hægt að setja fram spá
> 55	1. undirflokkur

Viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar

Prófun telst samþykktarhæf ef ertingarstig (IVIS) jákvæða samanburðarins er innan tveggja staðalfrávika frá núverandi rannsóknarsögulegu meðaltali en það skal uppfært a.m.k. á þriggja mánaða fresti eða í hvert sinn sem samþykktarhæf prófun er gerð í rannsóknarstofum þar sem prófanir eru sjaldan framkvæmdar (þ.e. sjaldnar en einu sinni í mánuði). Svaranir úr neikvæða samanburðinum eða samanburðinum með leysi eða burðarefni skulu hafa lægri niðurstöðugildi ógagnsæis og gegndræpis en sem nemur fastsettum efri mörkum fyrir bakgrunnsgildi ógagnsæis og gegndræpis fyrir glærur úr nautgripum sem eru meðhöndlaðar með neikvæðum samanburði eða samanburði með leysi eða burðarefni. Stök prófunarkeyrsla á a.m.k. þremur glærum ætti að nægja ef niðurstaðan gefur ótvíræða flokkun prófunaríðefnisins. Ef niðurstöður eru óvissar í fyrstu prófunarkeyrslu ætti að hafa í huga að framkvæma aðra prófunarkeyrslu (en þarf ekki endilega) og þá þriðju ef meðalgildi IVIS-niðurstaðna eru í ósamræmi við niðurstöður úr fyrstu keyrslunum tveimur. Í þessu samhengi teljast niðurstöður úr fyrstu prófunarkeyrslunni vera óvissar ef ekki var samræmi milli spánna sem fengust með glærunum þremur s.s.:

— tvær af glærunum þremur gáfu spár sem voru í ósamræmi við meðalgildi allra glæranna þriggja EÐA

— ein af glærunum þremur gaf spá sem var í ósamræmi við meðalgildi allra glæranna þriggja OG niðurstaðan sem var í ósamræmi var > 10 IVIS-einingar frá þröskuldsgildinu 55.

— ef endurtekna prófunarkeyrslan staðfestir spá upphaflegu prófunarkeyrslunnar (byggt á meðalgildi ertingarstigs í glasi) er hægt að taka endanlega ákvörðun án frekari prófana. Ef niðurstaðan úr endurteknu prófunarkeyrslunni er spá sem samsvarar ekki upphaflegu prófunarkeyrslunni (byggt á meðalgildi ertingarstigs í glasi) skal framkvæma þriðju og síðustu prófunarkeyrsluna til að fá ótvíræða spá og til að flokka prófunaríðefnið. Leyfilegt getur verið að fella niður frekari prófanir til flokkunar og merkingar ef niðurstaðan úr einhverri prófunarkeyrslu er spá um 1. undirflokk HSK SÞ.

Prófunarskýrsla

Í prófunarskýrslunni skulu vera eftirfarandi upplýsingar ef þær skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar:

Prófunar- og samanburðaríðefni:

— efnaheiti, s.s. byggingarheiti sem Upplýsingaþjónustan um íðefni (CAS) notar, og þar á eftir önnur þekkt heiti, CAS-skráningarnúmer (CAS-nr.) ef það er þekkt,

— hreinleiki og samsetning prófunar-/samanburðaríðefnisins (í hundraðshlutum miðað við þyngd) að því marki sem þær upplýsingar eru tiltækar,

— eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, s.s. eðlisástand, rokgirni, sýrustig, stöðugleiki, efnaflokkur og vatnsleysni,

— meðhöndlun prófunar- og samanburðaríðefnanna fyrir prófunina, ef við á (t.d. hitun, mölun),

— stöðugleiki, ef hann er þekktur.

Upplýsingar um bakhjarl og prófunarstöð

— heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra.

Skilyrði fyrir prófunaraðferðina

— ljósdeyfnimælir sem er notaður (t.d. tegund og nákvæm skilgreining) og tækjastillingar,

— kvörðunarupplýsingar fyrir búnað sem er notaður til að mæla ógagnsæi og gegndræpi (t.d. ljósdeyfnimæli og litrófsmæli) til að tryggja línuleika mælinga,

— gerð glæruhaldarans sem er notaður (t.d. tegund og forskriftir),

— lýsing á öðrum mælitækjum sem eru notuð,

— verklagið sem er notað til að tryggja heilleika (þ.e. nákvæmni og áreiðanleika) prófunaraðferðarinnar yfir tíma (t.d. reglubundin prófun á hæfnisíðefnum).

Viðmiðanir fyrir samþykktarhæfa prófun

— viðunandi svið fyrir samskeiða, jákvæðan og neikvæðan samanburð, byggð á rannsóknarsögulegum gögnum,

— viðunandi svið fyrir samskeiða viðmiðunarsamanburð, byggð á rannsóknarsögulegum gögnum, ef við á.

Söfnun og undirbúningur augna

— tilgreining á uppruna augnanna (þ.e. starfsstöðin þar sem þau voru tekin),

— þvermál glæru sem mælikvarði fyrir aldur dýrsins og hentugleika fyrir greininguna,

— skilyrði við geymslu og flutning augnanna (t.d. dagur og stund þegar þau voru tekin, tíminn sem leið fram að því að prófun hófst, flutningslausn og hitaskilyrði, öll sýkladrepandi efni sem voru notuð),

— undirbúningur og uppsetning glæra úr nautgripum, þ.m.t. yfirlýsingar varðandi gæði þeirra, hitastig glæruhaldara og viðmiðanir fyrir vali á glærum sem eru notaðar til prófunar.

Prófunaraðferð

— fjöldi samhliða sýna sem er notaður,

— einkenni neikvæða og jákvæða samanburðarins sem er notaður (ef við á, einnig leysissamanburðarins og viðmiðunarsamanburðarins),

— styrkur prófunaríðefnis, hvernig það er borið á, váhrifatími þess og lengd viðstöðu við prófunarskilyrði eftir váhrif,

— lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar,

— lýsing á viðmiðunum fyrir samþykkt rannsóknar sem eru notaðar,

— lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni,

— lýsing á viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar.

Niðurstöður

— Gögn úr hverju prófunarsýni, sett upp í töflu (t.d. ógagnsæis- og OD_{490}-gildi og útreikningur á ertingarstigum í glasi fyrir prófunaríðefnið og jákvæða og neikvæða samanburðinn og viðmiðunarsamanburðinn, ef haft með, í töfluformi, þ.m.t. gögn úr samhliða, endurteknum prófunum, eins og við á, og meðaltöl ± staðalfrávik fyrir hverja tilraun.

— lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu,

— flokkunin skv. HSK SÞ leidd af prófun í glasi, ef við á.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Ályktun

HEIMILDIR:

1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Í: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Í: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: Evrópumiðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM).

9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol*. 18:442-449.

10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Aðgengilegt á: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Efnahags- og framfarastofnunin.

14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. The Lancet 349: 636-641.

16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol*. 26:20-31.

17) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting.

18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Aðgengilegt á: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html’

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð.

Viðmiðunaríðefni: Íðefni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunaríðefni. Viðmiðunaríðefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) einsleitan og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við íðefnaflokkinn sem er verið að prófa, iii) þekkta eðlisfræðilega/efnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Neðansækin nálgun: Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir íðefni sem talið er að þurfi ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem þurfa ekki flokkun (neikvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (jákvæð niðurstaða).

Íðefni: Efni eða blanda.

Glæra: Gagnsær, fremsti hluti augans sem þekur lithimnuna og augasteininn og hleypir ljósi inn í augað.

Ógagnsæi glæru: Mæling á því að hvaða marki glæran verður ógagnsæ eftir váhrif frá prófunaríðefni. Aukið ógagnsæi glæru bendir til skemmda á henni. Hægt er að meta ógagnsæi á huglægan hátt, eins og gert er með Draize-augnprófun á kanínum, eða á hlutlægan hátt með mælitæki, s.s. ljósdeyfnimæli.

Gegndræpi glæru: Megindleg mæling á skemmdum á glæruþekjunni með ákvörðun á því magni natríumflúrskinslitarins sem fer í gegnum öll frumulög glærunnar.

Augnerting: Breytingar, sem eiga sér stað í auga eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á það, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags. Jafngildir „Afturhverf áhrif á augu“ og „2. undirflokkur HSK SÞ“ (4. heimild).

Falsneikvæðar niðurstöður: Hlutfall allra jákvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Falsjákvæðar niðurstöður: Hlutfall allra neikvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur verður fyrir váhrifum frá því efni.

Ertingarstig *í glasi* (IVIS): Reynsluformúla, notuð þannig í BCOP-prófunaraðferð að meðalgildi ógagnsæis og meðalgildi gegndræpis fyrir hvern meðferðarhóp eru sameinuð í eitt *í glasi*-stig fyrir hvern meðferðarhóp. Ertingarstig í glasi = meðalgildi ógagnsæis + (15 × meðalgildi gegndræpis).

Varanleg áhrif á augu: Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

Blanda: Tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í (4. heimild).

Neikvæður samanburður: Ómeðhöndlað, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum sem hafa verið meðhöndluð með prófunaríðefni, og öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn víxlverkar við prófunarkerfið.

Ekki flokkað: Íðefni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar (undirflokkar HSK SÞ 2, 2A eða 2B) eða alvarlegs augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ). Jafngildir „utan flokka í HSK SÞ“.

Ljósdeyfnimælir: Tæki sem mælir ógagnsæi glæru með megindlegu mati á því ljósi sem fer í gegnum hana. Dæmigert tæki hefur tvö hólf, hvort um sig með eigin ljósgjafa og ljósnema. Annað hólfið er notað undir meðhöndluðu glæruna en hitt er notað til að kvarða og núllstilla tækið. Ljósi frá halógenlampa er beint gegnum samanburðarhólf (tómt hólf án glugga eða vökva) á ljósnema og það borið saman við ljósið sem beint er gegnum tilraunahólfið, sem hýsir hólfið með glærunni, og á ljósnema. Tækið mælir muninn á ljósmagninu sem nær til ljósnemanna og sýnir ógagnsæisgildi í tölustöfum á stafrænum skjá.

Jákvæður samanburður: Samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með íðefni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

Afturhverf áhrif á augu: Sjá „Augnerting“.

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni.

Alvarlegur augnskaði: Vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið framan á augað (2. heimild), sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá áburði. Jafngildir „Varanleg áhrif á augu“ og „1. undirflokkur HSK SÞ“ (4. heimild).

Samanburður með leysi eða burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og er unnið með sýnum sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu og með öðrum samanburðarsýnum til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða, neikvæðu samanburðarsýni sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Efni: Frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar og óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem hægt er að skilja frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess (4. heimild).

Yfirborðsvirkt efni: Efni, s.s. þvotta- og hreinsiefni, sem getur minnkað yfirborðsspennu vökva og gerir því þannig kleift að freyða eða ganga inn í fast efni; efnið er einnig þekkt sem blotefni.

Blanda sem inniheldur yfirborðsvirkt efni: Í tengslum við þessa prófunaraðferð er þetta blanda sem inniheldur eitt eða fleiri yfirborðsvirk efni í lokastyrknum > 5%.

Ofansækin nálgun: þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir íðefni sem talið er að valdi alvarlegum augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (jákvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (neikvæð niðurstaða).

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Stigskipt prófunaráætlun: Þrepskipt prófunaráætlun þar sem allar upplýsingar um prófunaríðefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SÞ): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (4. heimild).

1. undirflokkur HSK SÞ: Sjá „Alvarlegur augnskaði“.

2. undirflokkur HSK SÞ: Sjá „Augnerting“.

Utan flokka í HSK SÞ: Íðefni sem uppfylla ekki kröfurnar varðandi flokkun í 1. eða 2. undirflokk HSK SÞ (2A eða 2B). Jafngildir „Ekki flokkað“.

Fullgilt prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nákvæm og áreiðanleg til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang.

Vægi rökstuddra vísbendinga: Ferli sem felst í því að vega og meta styrkleika og veikleika ýmissa upplýsinga við að draga ályktun um hugsanlega hættu af tilteknu prófunaríðefni og styðja þá niðurstöðu rökum.

———

2. viðbætir

FORSPÁRGETA BCOP-PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Tafla 1

Forspárgeta BCOP-prófunaraðferðarinnar til greiningar á íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða [(HSK SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 1. undirflokkur á móti ekki 1. undirflokkur (2. undirfl. + utan flokka); Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna (US EPA) I. flokkur á móti I. flokkur (II. fl. + III. fl. + IV. fl)]

Flokkunar-kerfi	Fjöldi	Nákvæmni		Næmi		Falsneikvæðar niðurstöður		Sértæki		Falsjákvæðar niðurstöður	
		%	Fjöldi	%	Fjöldi	%	Fjöldi	%	Fjöldi	%	Fjöldi
HSK SÞ Reglugerð (EB) nr. 1272/2008	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tafla 2

Forspárgeta BCOP-prófunaraðferðarinnar til greiningar á íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða („efni sem eru ekki ertandi“) [(HSK SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008 utan flokka á móti ekki utan flokka (1. undirfl. + 2. undirfl.); Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna (US EPA) IV. fl. á móti utan IV. fl. (I. fl + II. fl. + III. fl.)]

Flokkunar-kerfi	Fjöldi	Nákvæmni		Næmi		Falsneikvæðar niðurstöður		Sértæki		Falsjákvæðar niðurstöður	
		%	Fjöldi	%	Fjöldi	%	Fjöldi	%	Fjöldi	%	Fjöldi
HSK SÞ Reglugerð (EB) nr. 1272/2008	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

3. viðbætir

HÆFNISÍÐEFNI FYRIR BCOP-PRÓFUNARAÐFERÐINA

Áður en þessi prófunaraðferð er tekin til reglubundinnar notkunar ættu rannsóknarstofur að sýna fram á tæknilega hæfni með því að greina rétt hættuflokkun fyrir augu fyrir þau 13 íðefni sem eru ráðlögð í töflu 1. Þau efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið hættu fyrir augu samkvæmt niðurstöðum úr augnprófun í lífi á kanínum (TG 405) (17. heimild) og flokkunarkerfi HSK SÞ (þ.e. undirflokkum 1, 2A, 2B eða „Ekki flokkað“) (4. heimild). Aðrar valviðmiðanir voru að íðefnin fengjust á almennum markaði, að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í glasi fengin með BCOP-prófunaraðferðinni. Tilvísunargögn er að finna í „Streamlined Summary Document“ (3. heimild) og „Background Review Document“ ICCVAM-nefndarinnar vegna BCOP-prófunaraðferðarinnar (2. og 18. heimild).

Tafla 1

Íðefni sem eru ráðlögð til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir BCOP-prófunaraðferðina

Íðefni	CAS-númer	Efnaflokkur (1)	Eðlisástand	*Í lífi*-flokkun (2)	BCOP-flokkun
Bensalkóníumklóríð (5%)	8001-54-5	Óníumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Klórhexidín	55-56-1	Amín, amidín	Fast efni	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Díbensóýl-L-vínsýra	2743-38-6	Karboxýlsýra, estri	Fast efni	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Imídasól	288-32-4	Heturhringað	Fast efni	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Þríklórediksýra (30%)	76-03-9	Karboxýlsýra	Vökvi	1. undirflokkur	1. undirflokkur
2,6-díklórbensóýlklóríð	4659-45-4	Asýlhalíð	Vökvi	Undirflokkur 2A	Ekki er hægt að setja fram nákvæma/ áreiðanlega spá
Etýl-2-metýlasetóasetat	609-14-3	Ketón, estri	Vökvi	Undirflokkur 2B	Ekki er hægt að setja fram nákvæma/ áreiðanlega spá
Ammóníumnítrat	6484-52-2	Ólífrænt salt	Fast efni	2. undirflokkur (3)	Ekki er hægt að setja fram nákvæma/ áreiðanlega spá
EDTA, díkalíumsalt	25102-12-9	Amín, karboxýlsýra (salt)	Fast efni	Ekki flokkað	Ekki flokkað
Tween 20	9005-64-5	Estri, pólýetri	Vökvi	Ekki flokkað	Ekki flokkað

Íðefni	CAS-númer	Efnaflokkur (1)	Eðlisástand	*Í lífi*-flokkun (2)	BCOP-flokkun
2-merkaptópýrimídín	1450-85-7	Asýlhalíð	Fast efni	Ekki flokkað	Ekki flokkað
Fenýlbútasón	50-33-9	Heturhringað	Fast efni	Ekki flokkað	Ekki flokkað
Pólýoxýetýlen-23-lárýleter (BRIJ-35) (10%)	9002-92-0	Alkóhól	Vökvi	Ekki flokkað	Ekki flokkað

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

(1) Hverju prófunaríðefni var skipað í íðefnaflokk með því að nota staðlað flokkunarkerfi, byggt á flokkunarkerfi National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi á kanínuaugum (OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir) (17. heimild) og með notkun hnattsamræmds kerfis Sameinuðu þjóðanna (4. heimild).

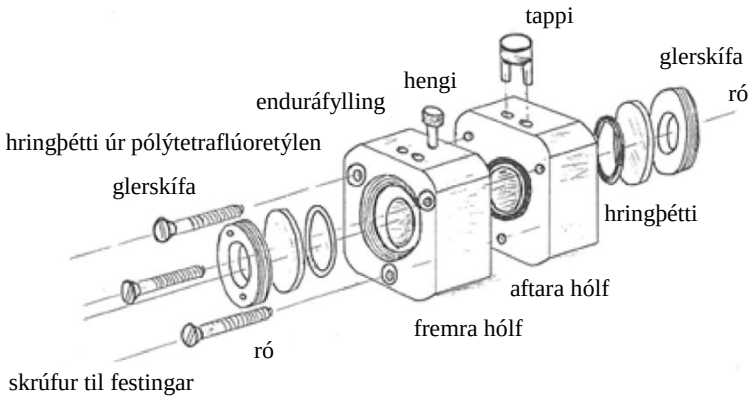
(3) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SÞ til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. eitt dýr af þremur á móti tvö dýr af þremur, sem sýna svörun á sjöunda degi, sem er nauðsynlegt til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Í rannsókn í lífi eru notuð þrjú dýr. Allir endapunktar, fyrir utan roða í slímhimnu hjá einu dýri, sýndu bata að stigi núll á sjöunda degi eða fyrr. Dýrið sem náði ekki fullum bata fyrir sjöunda dag hafði roða í slímhimnu svo nam einu stigi (á sjöunda degi) en náði fullum bata á tíunda degi.

4. viðbætir

GLÆRUHALDARI FYRIR BCOP-PRÓFUNARAÐFERÐINA

Glæruhaldarar fyrir BCOP-prófunaraðferðina eru gerðir úr hvarftregu efni (t.d. pólýprópýleni). Haldararnir samanstanda af tveimur helmingum (fremra og aftara hólfi) og eru með tvö eins sívöl innri hólf. Hvort hólf er gert til þess að taka um 5 ml að rúmmáli og er lokað með glerglugga sem mælingar á ógagnsæi eru gerðar gegnum. Hvort innra hólfið er 1,7 cm í þvermál og 2,2 cm á dýpt ([1]). Hringlaga þétti, sem er staðsett á aftara hólfinu, er notað til að koma í veg fyrir leka. Glærurnar eru settar með innþekjuna niður á hringlaga þétti aftara hólfanna og fremri hólfin eru sett á þekjuhlið glæranna. Hólfunum er haldið á réttum stað með þremur ryðfríum stálskrúfum sem eru staðsettar á ytri brúnum hólfsins. Á enda hvors hólfs er glergluggi sem hægt er að fjarlægja til að auðvelda aðgengi að glærunni. Annað hringþétti er einnig staðsett milli glergluggans og hólfsins til að koma í veg fyrir leka. Tvö göt ofan á hvoru hólfi gera kleift að setja í og fjarlægja æti og prófunaríðefni. Þeim er lokað með gúmmíhettum meðan á meðhöndlun og viðstöðu við prófunarskilyrði stendur. Ljósið sem fer í gegnum glæruhaldara getur verið breytilegt þar sem áhrif slits eða uppsöfnun tiltekinna íðefnaleifa í innri þvermálum hólfsins eða á glergluggum kann að hafa áhrif á ljósdreifingu eða endurvarp ljóss. Afleiðingarnar gætu verið aukning eða minnkun á grunnmagni gegnumferðar ljóss (og öfugt í mælingum á grunnviðmiðunum) í gegnum glæruhaldarana og kunna að koma fram í greinilegum breytingum á áætluðu grunngildunum við upphaflegu mælingarnar á ógagnsæi glæru í einstökum hólfum (þ.e. munur á upphaflegu gildi fyrir ógagnsæi glæru í tilteknum einstökum glæruhöldurum getur að jafnaði verið meiri en 2 eða 3 ógagnsæieiningar frá áætluðum viðmiðunargildum). Hver rannsóknarstofa ætti að taka til athugunar að koma á áætlun til að meta breytingar í gegnumferð ljóss í gegnum glæruhaldarana, háð eðli efnanna sem er verið að prófa og hversu oft hólfin eru notuð. Til að ákvarða viðmiðunargildi er hægt að kanna glæruhaldarana fyrir reglulega notkun með því að mæla grunngildi ógagnsæis glæru (eða gegnumferð ljóss) í hólfum sem eru fyllt með tilbúnu æti, án glæra. Glæruhaldararnir eru síðan kannaðir reglulega m.t.t. breytinga á gegnumferð ljóss á notkunartímanum. Hver rannsóknarstofa getur ákvarðað hversu oft skal athuga glæruhaldarana á grundvelli þeirra íðefna sem verið er að prófa, tíðni notkunar og athugana á breytingu á grunngildum ógagnsæis glæru. Ef í ljós koma greinilegar breytingar í gegnumferð ljóss um glæruhaldarana þarf að taka til athugunar viðeigandi aðferðir til hreinsunar og/eða slípunar á innra yfirborði glæruhaldaranna eða skipta þeim út.

Glæruhaldari: sundurgreind skýringarmynd



([1]) Uppgefin stærðarmál miðast við haldara sem er notaður fyrir glærur úr kúm sem eru á bilinu 12–60 mánaða. Ef notuð eru 6–12 mánaða gömul dýr þarf að hanna haldarann þannig að hvort hólf taki 4 ml að rúmmáli og hvort innri hólfanna sé 1,5 cm að þvermáli og 2,2 cm að dýpt. Þegar nýr glæruhaldari er hannaður er mjög mikilvægt að hlutfall yfirborðssvæðis glærunnar, sem er látin verða fyrir váhrifum, og rúmtak aftara hólfsins skuli vera hið sama og hlutfall þeirra í hefðbundnum glæruhaldara. Þetta er nauðsynlegt til að tryggja rétta ákvörðun gegndræpisgilda fyrir útreikninginn á ertingarstigi í glasi með tillagðri formúlu.

5. viðbætir

LJÓSDEYFNIMÆLIRINN

Ljósdeyfnimælirinn er búnaður sem mælir gegnumferð ljóss. Að því er varðar OP-KIT-búnaðinn frá Electro Design (Riom, Frakkland) sem er notaður til fullgildingar á BCOP-prófunaraðferðinni, er t.d. ljósi frá halógenlampa er beint gegnum samanburðarhólf (tómt hólf án glugga eða vökva) á ljósnema og það borið saman við ljósið sem beint er gegnum tilraunahólfið, sem hýsir hólfið með glærunni, og á ljósnema. Tækið mælir muninn á ljósmagninu sem nær til ljósnemanna og sýnir ógagnsæisgildi í tölustöfum á stafrænum skjá. Ógagnsæiseiningarnar eru ákvarðaðar. Heimilt er að nota aðrar tegundir ljósdeyfnimæla með mismunandi uppsetningu (sem t.d. þurfa ekki samhliða mælingar á samanburðarhólfinu og tilraunahólfinu) ef sýnt er fram á að þeir gefi svipaða niðurstöðu og fullgilti búnaðurinn.

Ljósdeyfnimælirinn á að gefa línulega svörun fyrir röð ógagnsæismælinga sem ná yfir þröskuldsgildin sem eru notuð fyrir mismunandi flokkun eins og lýst er í spálíkaninu (þ.e. upp að þröskuldsgildinu sem ákvarðar ætandi/mjög ertandi eiginleika). Nauðsynlegt er að kvarða ljósdeyfnimælinn með því að nota röð af kvörðunarþynnum til að tryggja línulegar og nákvæmar mælingar upp að 75–80 ógagnsæiseiningum. Kvörðunarþynnunum er komið fyrir í kvörðunarhólfinu (glæruhólf sem er gert til að halda kvörðunarþynnunum) og lesið af ljósdeyfnimælinum. Kvörðunarhólfið er gert til þess að halda kvörðunarþynnunum í um það bil sömu fjarlægð milli ljóssins og ljósnemans og glærurnar væru settar í við ógagnsæimælingarnar. Viðmiðunargildi og upphaflegur stillipunktur fer eftir gerð búnaðarins sem er notaður. Tryggja ætti línuleika ógagnsæismælinganna með viðeigandi aðgerðum (m.t.t. tækis). Að því er varðar OP-KIT-búnaðinn frá Electro Design (Riom, Frakkland) er ljósdeyfnimælirinn fyrst kvarðaður við 0 ógagnsæieiningar með því að hafa kvörðunarhólfið án kvörðunarþynnu. Síðan er þremur mismunandi kvörðunarþynnum komið fyrir í kvörðunarhólfinu, einni í einu, og ógagnsæið mælt. Kvörðunarþynnur 1, 2 og 3 eiga að gefa niðurstöður sem eru jafnar gildinu sem stillt er á, 75, 150 og 225 ógagnsæiseiningar í þeirri röð, ± 5%“

13) Í stað kafla B.48 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.48 **ICE-prófunaraðferðin (aðferð til prófunar á einangruðu auga úr kjúklingi) til greiningar á i. íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða og ii. íðefnum sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 438 um prófanir (2013). Samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) mat ICE-prófunaraðferðina (aðferð til prófunar á einangruðu auga úr kjúklingi) ásamt Evrópumiðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) og Japansmiðstöð fyrir fullgildingu staðgönguaðferða (JaCVAM) á árunum 2006 og 2010 (1.–3. heimild). Í fyrra matinu var ICE-prófunaraðferðinni lýst sem vísindalega fullgildri prófunaraðferð til notkunar sem skimunarprófun til að greina íðefni (efni og blöndur) sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur) eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1., 2. og 4. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna ([1]). Í seinna matinu var ICE-prófunaraðferðin metin út frá notkun sem skimunarprófun til að greina íðefni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða eins og skilgreint er í HSK SÞ (3. og 4. heimild). Niðurstöður úr fullgildingarrannsókninni og ráðleggingar vísindaritrýnihópsins studdu upphaflegu ráðleggingarnar um að nota ICE-prófunaraðferðina til greiningar á íðefnum sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ) þar sem engin breyting hafði orðið á tiltæka gagnagrunninum frá fyrstu ICCVAM-fullgildingunni. Á því stigi voru ekki settar fram frekari ráðleggingar varðandi rýmkun á notkunarsviði ICE-prófunaraðferðarinnar til að hún nái einnig yfir aðra undirflokka. Fram fór endurmat á gagnasafni rannsókna í glasi og í lífi sem er notað í fullgildingarrannsókninni þar sem

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

áherslan var á að meta gagnsemi ICE-prófunaraðferðarinnar til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða (5. heimild). Í þessu endurmati var ályktað að ICE-prófunaraðferðina væri einnig hægt að nota til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða, eins og skilgreint er í HSK SÞ (5. heimild). Þessi prófunaraðferð felur í sér ráðlagða notkun og takmarkanir ICE-prófunaraðferðarinnar sem byggja á þessu mati. Meginmunurinn á upprunalegu útgáfunni frá 2009 og uppfærðu útgáfunni frá 2013 á OECD-viðmiðunarreglunum um prófanir varðar, en er ekki takmarkaður við, notkun á ICE-prófunaraðferðinni til að greina íðefni sem þurfa ekki flokkun samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ, uppfærslu á þáttum í prófunarskýrslunni, uppfærslu á 1. viðbæti varðandi skilgreiningar og uppfærslu á 2. viðbæti varðandi hæfnisíðefnin.

Nú er almennt viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin augnertingarprófun í glasi komið í stað Draize-augnprófunarinnar í lífi til að spá fyrir um allar tegundir ertinga fyrir mismunandi íðefnaflokka. Stefnumiðaðar samsetningar nokkurra staðgönguprófunaraðferða innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar gætu þó komið í stað Draize-augnprófunarinnar (6. heimild). Ofansækin nálgun (7. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni hafi mikinn ertingarmátt en neðansækin nálgun (7. heimild) er hönnuð til að nota þegar ekki er búist við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni valdi nægilegri augnertingu til að þörf sé á flokkun. ICE-prófunaraðferðin er aðferð til prófunar í glasi sem er hægt að nota, við tilteknar aðstæður og með tilteknum takmörkunum, eins og lýst er í 8.–10. lið, til flokkunar og merkingar á íðefnum sem eru hættuleg fyrir augu. Þótt ICE-prófunaraðferðin sé ekki talin gild sem sjálfstæður valkostur í stað augnprófunar í lífi á kanínum er hún ráðlögð sem upphafsstig innan prófunaráætlunar, s.s. ofansækinnar nálgunar eins og fram kemur í Scott et al. (7. heimild), til að greina íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða, þ.e. íðefni sem skulu flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ, án frekari prófana (4. heimild). Einnig er mælt með ICE-prófunaraðferðinni til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða, eins og skilgreint er í HSK SÞ (utan flokka) (4. heimild), og má því nota hana sem upphafsstig innan prófunaráætlunar með neðansækinni nálgun (7. heimild). Íðefni sem ekki er spáð að valdi alvarlegum augnskaða eða er ekki flokkað m.t.t. augnertingar/alvarlegs augnskaða með ICE-prófunaraðferðinni þarf þó viðbótarprófun (í glasi og/eða í lífi) til að ákveða endanlega flokkun. Enn fremur ætti að hafa samráð við viðeigandi eftirlitsyfirvöld áður en ICE-prófunaraðferðin er notuð í neðansækinni nálgun samkvæmt öðrum flokkunarkerfum en HSK SÞ.

Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðunum sem eru notaðar til að meta möguleikann á hættulegum áhrifum prófunaríðefnisins á augu með mælingu á getu þess til að kalla fram, eða kalla ekki fram, eiturhrif í auga sem er numið brott úr kjúklingi. Eiturhrif á glæruna eru mæld með i) eigindlegu mati á ógagnsæi, ii) eigindlegu mati á skemmdum á þekju sem er byggt á því að borin er flúrskinslausn á augað (flúrskinsgeymd), iii) megindlegri mælingu á aukinni þykkt (bólgu) og iv) eigindlegu mati á stórsæjum, formfræðilegum skemmdum á yfirborðinu. Ógagnsæi glæru, bólga og skemmdir eftir váhrif frá prófunaríðefninu eru metin hvert um sig og síðan í sameiningu til að fá fram flokkun á augnertingu.

Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

Þessi prófunaraðferð er byggð á aðferðarlýsingu sem lögð er til í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 160 (8. heimild) sem var þróuð í kjölfar alþjóðlegrar fullgildingarrannsóknar ICCVAM-nefndarinnar (1., 3. og 9. heimild), með tillagi frá Evrópumiðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM), Japansmiðstöð fyrir fullgildingu staðgönguaðferða (JaCVAM) og TNO-rannsóknastofnuninni í Hollandi, deild eiturefnafræði og hagnýtrar lyfjafræði (e. *TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology*) (Hollandi). Aðferðalýsingin er byggð á upplýsingum úr birtum aðferðarlýsingum, sem og þeirri aðferðarlýsingu sem TNO-rannsóknastofnunin notar nú (10.–14. heimild).

Margvísleg efni hafa verið prófuð við fullgildinguna, sem liggur til grundvallar þessari prófunaraðferð, og gagnasafn fullgildingarrannsóknarinnar, byggt á athugunum, náði yfir 152 íðefni þ.m.t. 72 efni og 80 blöndur (5. heimild). Þessi prófunaraðferð á við fyrir föst efni, vökva, fleyti og hlaup. Vökvarnir mega vera vatnskenndir eða ekki vatnskenndir og föstu efnin mega vera uppleysanleg eða óleysanleg í vatni. Ekki er enn búið að meta lofttegundir og úðaefni í fullgildingarrannsókn.

ICE-prófunaraðferðina er hægt að nota til að greina íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða, þ.e. íðefni sem skulu flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ (4. heimild). Tilgreindar takmarkanir ICE-prófunaraðferðarinnar, þegar hún er notuð í þessum tilgangi, byggjast á háu hlutfalli falsjákvæðra niðurstaðna fyrir alkóhól og háu hlutfalli falsneikvæðra niðurstaðna fyrir föst efni og yfirborðsvirk efni (1., 3. og 9. heimild). Hins vegar eru falsneikvæðu niðurstöðurnar í þessu samhengi ekki mikilvægar (efni í 1. undirflokki HSK SÞ greinast ekki í 1. undirflokki HSK SÞ) þar sem öll prófunaríðefni sem gefa neikvæða niðurstöðu myndu því næst verða prófuð með öðrum fullnægjandi fullgiltum prófunum í glasi eða, sem síðasta valkost, á kanínum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga. Hafa ætti í huga að föst efni geta leitt til breytilegra og mikilla váhrifaaðstæðna við Draize-augnertingarprófun í glasi sem gæti leitt til spáa sem eiga ekki við um raunverulegan ertingarmátt þeirra (15. heimild). Rannsakendur geta íhugað að nota þessa prófunaraðferð fyrir allar gerðir íðefna og þá skal jákvæð niðurstaða samþykkt sem vísbending um alvarlegan augnskaða, þ.e. flokkun í 1. undirflokk HSK SÞ án frekari prófana. Þó skal túlka jákvæðar niðurstöður, sem eru fengnar með alkóhólum, með varúð vegna hættunnar á ofmati.

Þegar ICE-prófunaraðferðin er notuð til að greina íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ) er heildarnákvæmni hennar 86% (120/140), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna er 6% (7/113) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna er 48% (13/27), þegar aðferðin er borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð í lífi sem eru flokkuð samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ (4. og 5. heimild).

ICE-prófunaraðferðina er einnig hægt að nota til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða samkvæmt flokkunarkerfi HSK SÞ (4. heimild). Hafa ætti samráð við viðeigandi eftirlitsyfirvöld áður en ICE-prófunaraðferðin er notuð í neðansækinni nálgun samkvæmt öðrum flokkunarkerfum. Hægt er að nota þessa prófunaraðferð fyrir allar gerðir íðefna og þá má samþykkja að með neikvæðri niðurstöðu flokkist íðefni ekki sem augnertandi og það valdi alvarlegum augnskaða. Þó er mögulegt að gróðurhindrandi málning sem inniheldur lífræna leysa getið verið vanmetin á grundvelli einnar niðurstöðu úr fullgildingargagnagrunninum (5. heimild).

Þegar ICE-prófunaraðferðin er notuð til að greina íðefni sem ekki þurfa flokkun m.t.t. augnertingar og alvarlegs augnskaða er heildarnákvæmni hennar 82% (125/152), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna er 33% (26/79) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna er 1% (1/73), þegar aðferðin er borin saman við gögn úr augnprófunum á kanínu með aðferð í lífi sem eru flokkuð samkvæmt HSK SÞ (4. og 5. heimild). Þegar prófunaríðefni í tilteknum flokkum (þ.e. gróðurhindrandi málning sem inniheldur lífrænan leysi) eru ekki höfð í gagnasafninu er nákvæmni ICE-prófunaraðferðarinnar 83% (123/149), hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna er 33% (26/78) og falsneikvæðra niðurstaðna er 0% (0/71) fyrir flokkunarkerfi HSK SÞ (4. og 5. heimild).

Ekki er mælt með ICE-prófunaraðferðinni til greiningar á prófunaríðefnum sem ætti að flokka sem augnertandi (þ.e. 2. undirflokkur HSK SÞ eða undirflokkur 2A) eða prófunaríðefni sem ætti að flokka sem lítið augnertandi (HSK SÞ, undirflokkur 2B) vegna þess mikla fjölda íðefna í 1. undirflokki HSK SÞ sem eru undirflokkuð í 2. undirflokk HSK SÞ og undirflokka 2A eða 2B og íðefna utan flokka í HSK SÞ sem eru yfirflokkuð í 2. undirflokk HSK SÞ og undirflokka 2A eða 2B. Í þessum tilgangi getur verið nauðsynlegt að gera frekari prófanir með annarri hentugri aðferð.

Allar aðferðir, þar sem notuð eru augu úr kjúklingum, skulu fylgja gildandi reglum og verklagi prófunarstöðvarinnar fyrir meðhöndlun á efnum sem eru unnin úr mönnum eða dýrum, þ.m.t., en ekki takmarkað við, vefjum og vefjavökvum. Mælst er til að notaðar séu alþjóðlegar varúðarráðstafanir fyrir rannsóknarstofur (16. heimild).

Þó að ICE-prófunaraðferðin taki ekki til táru- eða lituskaða, sem eru metin með aðferðinni til prófunar á augnertingu hjá kanínum, þá tekur hún á áhrifum á glæru sem eru mikilvægasti þátturinn í *í lífi*-flokkun með tilliti til flokkunar samkvæmt HSK SÞ. Þótt ekki sé heldur hægt að meta með ICE-prófunaraðferðinni sem slíkri hvort vefjaskemmdir í augum gangi til baka þá hefur verið lagt til, á grundvelli rannsókna á kanínuaugum, að nota megi mat á upphafsdýpt glæruskaða til að greina sumar gerðir varanlegra áhrifa (17. heimild). Einkum er þörf á frekari vísindaþekkingu til að skilja hvernig varanleg áhrif, sem tengjast ekki upphaflega alvarlega skaðanum, verða til. Að lokum gefur ICE-prófunaraðferðin ekki færi á mati á möguleikanum á altækum eiturhrifum sem tengjast váhrifum á augu.

Þessi prófunaraðferð verður uppfærð reglulega eftir því sem nýjar upplýsingar og gögn eru tekin til athugunar. Vefjameinafræði getur t.d. hugsanlega verið gagnleg þegar þörf er á fyllri lýsingu á skemmdum á glæru. Til að meta þennan möguleika eru notendur hvattir til að varðveita augu og undirbúa sýni til vefjameinafræðilegarar athugunar sem hægt er að nota til að þróa gagnagrunn og viðmiðanir fyrir ákvarðanir sem geta aukið enn frekar nákvæmni þessarar prófunaraðferðar. Efnahags- og framfarastofnunin hefur þróað leiðbeiningarskjal um notkun aðferða til prófunar í glasi á augneiturhrifum sem felur í sér nákvæmar verklagsreglur um söfnun sýna til vefjameinafræðilegrar athugunar og upplýsingar um hvar skuli leggja fram vefjameinafræðileg sýni og/eða gögn (8. heimild).

Sérhver rannsóknarstofa, sem gerir þessa greiningu í fyrsta sinn, skal nota hæfnisíðefnin sem kveðið er á um í 2. viðbæti. Rannsóknarstofu er heimilt að nota þessi efni til að sýna fram á tæknilega færni sína við framkvæmd ICE-prófunaraðferðarinnar áður en hún leggur inn gögn, fengin með ICE-prófun, vegna lögbundinnar flokkunar í hættuflokka.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

ICE-prófunaraðferðin er líffærislíkan *í glasi* sem viðheldur í stuttan tíma virkni auga úr kjúklingi. Með þessari prófunaraðferð eru skemmdir af völdum prófunaríðefnisins metnar með ákvörðun á bólgu í glæru, ógagnsæi og flúrskinsgeymd. Þó að seinni breyturnar tvær feli í sér eigindlegt mat er greiningin á bólgu í glæru megindleg. Hver mæling er ýmist umreiknuð yfir í megindleg stig, sem eru notuð til að reikna út heildarstuðul fyrir ertingu, eða fær eigindlega undirflokkun sem er notuð til að tilgreina hættuflokkun *í glasi* fyrir augu, annað hvort í 1. undirflokk HSK SÞ eða utan flokks í HSK SÞ. Síðan er hægt að nota hvora sem er af þessum niðurstöðum til að spá fyrir um möguleikann á alvarlegum augnskaða *í lífi* eða að ekki sé þörf á flokkun prófunaríðefnis m.t.t. hættu fyrir augu (sjá „Viðmiðanir fyrir ákvarðanir“). Þó er ekki hægt að gefa upp neina flokkun fyrir íðefni sem ekki er spáð að valdi alvarlegum augnskaða eða eru ekki flokkuð með ICE-prófunaraðferðinni (sjá 11. lið).

Uppruni og aldur augna úr kjúklingum

Venjan er sú að í þessari greiningu séu notuð augu úr kjúklingum sem eru fengnir frá sláturhúsi, þar sem þeim er slátrað til manneldis, og því engin þörf á tilraunadýrum. Eingöngu eru notuð augu úr heilbrigðum dýrum sem eru talin hæf til að fara inn í matvælaferlið.

Þó að ekki hafi verið gerð rannsókn með samanburði til að meta kjöraldur kjúklinganna er venjan sú að aldur og þyngd kjúklinga, sem eru notaðir í þessari prófunaraðferð, sé samkvæmt hefðbundinni vinnslu í alifuglasláturhúsi (þ.e. um það bil 7 vikna gamlir, 1,5–2,5 kg).

Söfnun og flutningur augna til rannsóknarstofunnar

Hausarnir skulu fjarlægðir um leið og kjúklingarnir hafa verið róaðir, yfirleitt með rafstuði, og skorið hefur verið í hálsinn til blóðtæmingar. Kjúklinganna skal aflað í nágrenni við rannsóknarstofuna svo að hægt sé að flytja hausana á milli sláturhúss og rannsóknarstofu nægilega fljótt til að skemmdir og/eða bakteríusmit verði í lágmarki. Tímabilið milli töku kjúklingahausanna og þess að augun eru sett í hólfið í yfirhellingarbúnaðinum eftir brottnám ætti að vera sem styst (að jafnaði styttra en tvær klukkustundir) til að tryggja að samþykktarviðmiðanir greiningarinnar séu uppfylltar. Öll augu, sem eru notuð í greiningunni, skulu vera úr sama samsafni augna, teknu á tilgreindum degi.

Þar eð augun eru skorin úr á rannsóknarstofunni eru hausarnir fluttir ósnertir frá sláturhúsinu í plastílátum við umhverfishita (yfirleitt á bilinu 18 °C til 25 °C) og haldið rökum með þurrkum sem eru vættar í jafnþrýstinni saltlausn.

Valviðmiðanir fyrir augu og fjöldi augna sem eru notuð í ICE-prófuninni

Augum með mörg grunnviðmiðunarstig litunar eftir flúrskinslausn (þ.e. > 0,5) eða mörg ógagnsæisstig glæru (þ.e. > 0,5) eftir brottnám er hafnað.

Hver meðferðarhópur og samskeiða, jákvæður samanburður samanstendur af minnst þremur augum. Neikvæði samanburðarhópurinn eða samanburðurinn með leysi (ef notaður er annar leysir en saltlausn) er minnst eitt auga.

Ef um er að ræða föst efni sem fá niðurstöðuna að þau lendi utan flokka í HSK SÞ er mælt með annarri keyrslu á þremur augum til að staðfesta eða hrekja neikvæða niðurstöðu.

VERKFERLI

Undirbúningur augnanna

Augnlokin eru skorin varlega burt og þess gætt að skemma ekki glæruna. Heilleiki glærunnar er metinn snöggt með dropa af 2% (massi miðað við rúmmál) natríumflúrskinslausn sem er höfð á yfirborði glærunnar í nokkrar sekúndur og síðan skoluð af með jafnþrýstinni saltlausn. Síðan eru augun, sem hafa verið meðhöndluð með flúrskinslausn, skoðuð með raufarlampasmásjá til að ganga úr skugga um að glæran sé óskemmd (þ.e. að stig flúrskinsgeymdar og ógagnsæi glæru séu $\leq 0{,}5$).

Ef augað er óskemmt er það síðan skorið alveg úr hauskúpunni og þess gætt að skemma ekki glæruna. Augað er togað úr tóttinni með því að taka þétt í blikhimnuna með læknatöng og klippt á augnvöðvana með bognum skærum með ávölum oddi. Það er mikilvægt að skemma ekki glærurnar með of miklum þrýstingi (þ.e. valda þrýstingsskemmdum).

Skilja skal eftir sýnilegan hluta af sjóntauginni fastri við augað þegar það er fjarlægt úr tóttinni. Þegar augað hefur verið fjarlægt úr tóttinni er það sett á ídrægt undirlag og blikhimnan og annar bandvefur skorin frá.

Brottnumda auganu er komið fyrir í klemmu úr ryðfríu stáli og með glæruna lóðrétta. Klemman er síðan flutt í hólf í yfirhellingarbúnaðinum (18. heimild). Koma skal klemmunum þannig fyrir í yfirhellingarbúnaðinum að jafnþrýstin saltlausn leki yfir alla glæruna (3–4 dropar á mínútu eða 0,1–0,15 ml/mín). Hólfin í yfirhellingarbúnaðinum skulu stillt á hitastigið 32 ± 1,5 °C. Í 3. viðbæti er skýringarmynd af dæmigerðum yfirhellingarbúnaði og augnklemmum sem hægt er að kaupa eða búa til. Hægt er að breyta búnaðinum svo að hann uppfylli þarfir einstakra rannsóknarstofa (t.d. til að hægt sé að koma fyrir mismunandi fjölda augna).

Þegar augunum hefur verið komið fyrir í yfirhellingarbúnaðinum eru þau skoðuð aftur með raufarlampasmásjá til að ganga úr skugga um að þau hafi ekki skemmst þegar þau voru skorin úr. Um leið skal mæla þykkt glæranna á topppunkti hennar með þykktarmælinum á raufarlampasmásjánni. Augum með i) flúrskinsgeymdarstig sem eru > 0,5, ii) ógagnsæi glæru sem er > 0,5 eða iii) einhver viðbótarmerki um skemmdir skal skipt út. Augum, sem er ekki hafnað vegna einhverra þessara viðmiðana en eru með glæruþykkt sem víkur meira en 10% frá meðalgildi allra augna, skal hafnað. Notendur þurfa að hafa í huga að niðurstöður mælinga á þykkt glæru með raufarlampasmásjá geta verið mismunandi eftir mismunandi stillingum á raufarbreiddinni. Raufarbreiddin skal stillt á 0,095 mm.

Þegar búið er að skoða og samþykkja öll augun skulu þau látin standa í u.þ.b. 45–60 mínútur til að jafnvægisstilla þau við prófunarkerfið áður en prófunarefnið er borið á. Eftir jafnvægisstillinguna er skráð núlltilvísunarmæling á þykkt og ógagnsæi glæru sem er grunnviðmiðun (þ.e. tími = 0). Flúrlitunarstigin, sem voru ákvörðuð þegar augun voru skorin úr, eru notuð sem grunnviðmiðunarmæling fyrir þann endapunkt.

Prófunaríðefnið borið á

Strax eftir núllviðmiðunarmælingarnar er augað tekið (í haldara sínum) úr yfirhellingarbúnaðinum, sett í lárétta stöðu og prófunaríðefnið borið á glæruna.

Fljótandi prófunaríðefni eru að jafnaði prófuð óþynnt en það má þynna þau ef það er talið nauðsynlegt (t.d. sem hluti af tilhögun rannsóknarinnar). Mælt er með lífeðlisfræðilegri saltlausn sem leysi fyrir þynnt íðefni. Þó má einnig nota aðra leysa við stýrð skilyrði en sýna skal fram á heppileika annarra leysa en lífeðlisfræðilegrar saltlausnar.

Fljótandi prófunaríðefni eru borin þannig á glæruna að prófunaríðefnið þeki allt yfirborð hennar jafnt (staðalrúmmálið er 0,03 ml).

Ef það er gerlegt skulu föst íðefni möluð eins fínt og unnt er í mortéli með staut eða öðru sambærilegu mölunartæki. Duftið er borið þannig á glæruna að prófunaríðefnið þeki allt yfirborð hennar jafnt (staðalmagnið er 0,03 g).

Prófunaríðefnið (fljótandi eða fast) er haft á í 10 sekúndur og síðan skolað af auganu með jafnþrýstinni saltlausn (um það bil 20 ml) við umhverfishita. Augað (í haldara sínum) er síðan sett aftur í yfirhellingarbúnaðinn í upphaflegu, uppréttu stöðunni. Ef þörf krefur er hægt að skola frekar 10 sekúndum eftir að borið var á og á síðari tímapunktum (t.d. ef leifar prófunaríðefnis finnast á glæru). Almennt er það magn saltlausnar sem notuð er til viðbótar til hreinsunar ekki úrslitaatriði en mikilvægt er að fylgjast með því hvort íðefni loði við glæruna.

Samanburðaríðefni

Í hverri tilraun skal vera samskeiða, neikvæður samanburður eða samanburður með leysi eða burðarefni, og jákvæður samanburður.

Ef prófaðir eru óþynntir vökvar eða föst efni skal nota lífeðlisfræðilega saltlausn sem samskeiða, neikvæðan samanburð í ICE-prófunaraðferðinni til að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að tryggja að greiningarskilyrðin leiði ekki af sér ertingarsvörun sem á ekki við.

Ef prófaðir eru þynntir vökvar er samskeiða samanburðarhópur með leysi eða burðarefni hafður með í prófunaraðferðinni til að greina ósértækar breytingar í prófunarkerfinu og til að tryggja að greiningarskilyrðin leiði ekki af sér ertingarsvörun sem á ekki við. Eins og fram kemur í 31. lið má aðeins nota leysi eða burðarefni sem sýnt hefur verið fram á að hafi engin skaðleg áhrif á prófunarkerfið.

Þekkt, augnertandi efni er haft með í hverri tilraun sem samskeiða, jákvæður samanburður til að sannreyna að fram komi viðeigandi svörun. Þar eð ICE-greiningin er notuð í þessari prófunaraðferð til að greina ætandi eða mjög ertandi efni skal jákvæði samanburðurinn vera viðmiðunaríðefni sem framkallar mikla svörun með þessari prófunaraðferð. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi mikla svörun þó ekki vera of kröftug. Fá skal fram nóg af gögnum um jákvæða samanburðinn úr prófunum í glasi til að unnt sé að reikna út tölfræðilega skilgreint, viðunandi svið fyrir hann. Ef ekki eru tiltæk fullnægjandi rannsóknarsöguleg gögn úr ICE-prófunaraðferð fyrir tiltekinn, jákvæðan samanburð getur þurft að gera rannsóknir til að fá þær upplýsingar.

Dæmi um jákvæðan samanburð fyrir fljótandi prófunaríðefni eru 10% ediksýra eða 5% bensalkóníumklór en dæmi um jákvæðan samanburð fyrir föst prófunaríðefni eru natríumhýdroxíð eða imídasól.

Viðmiðunaríðefni eru gagnleg til að meta augnertingarmátt óþekktra íðefna í tilgreindum íðefna- eða vöruflokki eða til að meta hlutfallslegan ertingarmátt augnertandi efnis á tilteknu ertingarsvörunarsviði.

Endapunktar mældir

Meðhöndlaðar glærur eru metnar fyrir meðhöndlunina og 30, 75, 120, 180 og 240 mínútum (± 5 mínútur) eftir skolun að lokinni meðhöndluninni. Með þessum tímapunktum fæst fullnægjandi fjöldi mælinga á fjögurra klukkustunda meðhöndlunartímabilinu og nægur tími milli mælinga til að gera tilskildar athuganir á öllum augum.

Endapunktarnir, sem eru metnir, eru ógagnsæi glæru, bólga, flúrskinsgeymd og formfræðileg áhrif (t.d. holun þekju eða los á henni). Allir endapunktarnir, að flúrskinsgeymd undantekinni (sem er aðeins ákvörðuð fyrir meðhöndlun og 30 mínútum eftir váhrif frá prófunaríðefninu), eru ákvarðaðir á hverjum af framangreindum tímapunktum.

Ráðlagt er að nota ljósmyndir til að skrá ógagnsæi glæru, flúrskinsgeymd, formfræðileg áhrif og, ef hún er athuguð, vefjameinafræði.

Eftir lokarannsóknina í lok fjögurra klukkustunda tímabilsins er ráðlagt að varðveita augun í viðeigandi festiefni (t.d. formalíni með hlutlausum jafna) vegna hugsanlegrar, vefjameinafræðilegrar rannsóknar (sjá 14. lið og 8. heimild fyrir frekari upplýsingar).

Bólga í glæru er ákvörðuð út frá mælingum á glæruþykkt sem eru gerðar með glæruþykktarmæli á raufarlampasmásjá. Hún er gefin upp í hundraðshlutum og er reiknuð út frá mælingum á glæruþykkt samkvæmt eftirfarandi formúlu:

$$\left(\frac{\text{glæruþykkt á tíma t} - \text{glæruþykkt á tíma} = 0}{\text{glæruþykkt á tíma} = 0}\right) \times 100$$

Meðalhundraðshluti bólgu í glæru fyrir öll prófunaraugun er reiknaður fyrir alla athugunartímapunkta. Síðan er hverju prófunaríðefni gefin heildarstig til undirflokkunar sem byggjast á hæsta meðalgildi fyrir bólgu í glæru, eins og það mælist á hvaða tímapunkti sem er (sjá 51. lið).

Ógagnsæisstig glæru er metið út frá því svæði á glærunni sem er ógagnsæjast eins og sýnt er í töflu 1. Meðalgildi ógagnsæis glæru fyrir öll prófunaraugun er reiknað fyrir alla athugunartímapunkta. Síðan er hverju prófunaríðefni gefin heildarstig til undirflokkunar sem byggjast á hæsta meðalgildi fyrir ógagnsæi glæru, eins og það mælist á hvaða tímapunkti sem er (sjá 51. lið).

Tafla 1

Ógagnsæisstig glæru

Stig	Athugun
0	Ekkert ógagnsæi
0,5	Mjög lítið ógagnsæi
1	Dreifð eða óljós svæði, smáatriði í lithimnu mjög greinileg
2	Auðgreinanleg, hálfgagnsæ svæði, smáatriði í lithimnu örlítið óskýr
3	Mjög mikið ógagnsæi glæru, engin smáatriði lithimnu sjáanleg, stærð sjáaldurs varla greinanleg
4	Ógagnsæi glæru algert, lithimna sést ekki

Flúrskinsgeymd er aðeins metin á 30 mínútna athugunartímapunktinum eins og sýnt er í töflu 2. Meðalgildi flúrskinsgeymdar fyrir öll prófunaraugu er þá reiknað fyrir 30 mínútna athugunartímapunktinn og er notað til að gefa heildarstig til undirflokkunar fyrir hvert prófunaríðefni (sjá 51. lið).

Tafla 2

Flúrskinsgeymdarstig

Stig	Athugun
0	Engin flúrskinsgeymd
0,5	Mjög óveruleg litun stakra frumna
1	Litun stakra frumna, dreifðra um allt meðhöndlaða svæðið á glærunni
2	Þétt litun stakra, staðbundinna frumna eða samliggjandi frumna
3	Flúrskinsgeymd stórra, samliggjandi svæða á glærunni

Meðal formfræðilegra áhrifa er „holun“ í frumum glæruþekju, „los“ á þekju, „hrjúfara“ glæruyfirborð og „viðloðun“ prófunaríðefnisins við glæruna. Munur getur verið á alvarleika þessara áhrifa og þau geta komið fram samtímis. Flokkun þeirra er huglæg og háð túlkun rannsakandans.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

Meta skal niðurstöður vegna ógagnsæis glæru, bólgu og flúrskinsgeymdar hverja fyrir sig til að fá fram ICE-flokk fyrir hvern endapunkt. Síðan eru ICE-flokkarnir fyrir hvern endapunkt sameinaðir til að fá fram ertingarflokkun fyrir hvert prófunaríðefni.

Viðmiðanir fyrir ákvarðanir

Þegar búið er að meta hvern endapunkt er hægt að ákvarða ICE-flokka í samræmi við fyrirframákveðið svið. Bólga í glæru (3. tafla), ógagnsæi glæru (4. tafla) og flúrskinsgeymd glæru (5. tafla) eru túlkuð með því að nota fjóra ICE-flokka samkvæmt kvörðunum hér á eftir. Mikilvægt er að taka mið af því að glærubólgustigin sem eru sýnd í töflu 3 eiga aðeins við ef þykktin er mæld með raufarlampasmásjá (t.d. Haag-Streit BP900) með dýptarmælitæki nr. 1 og raufarbreidd stilltri á $9\,{}^{1}/_{2}$, sem jafngildir 0,095 mm. Notendur þurfa að hafa í huga að niðurstöður mælinga á þykkt glæru með raufarlampasmásjá geta verið mismunandi eftir mismunandi stillingum á raufarbreiddinni.

Tafla 3

Viðmiðanir fyrir ICE-flokkun á bólgu í glæru

Meðalgildi bólgu í glæru (%) (*)	ICE-flokkur
0 til 5	I
> 5 til 12	II

Meðalgildi bólgu í glæru (%) (*)	ICE-flokkur
> 12 til 18 (> 75 mín. eftir meðhöndlun)	II
> 12 til 18 (≤ 75 mín. eftir meðhöndlun)	III
> 18 til 26	III
> 26 til 32 (> 75 mín. eftir meðhöndlun)	III
> 26 til 32 (≤ 75 mín. eftir meðhöndlun)	IV
> 32	IV

(*) Hæsta meðalgildi eins og það mælist á hvaða tímapunkti sem er.

Tafla 4

Viðmiðanir fyrir ICE-flokkun á ógagnsæi

Hæsta meðalgildi ógagnsæisstigs (*)	ICE-flokkur
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Hæsta meðalgildi sem mælist á hvaða tímapunkti sem er (byggt á ógagnsæisstigi eins og það er skilgreint í töflu 1).

Tafla 5

Viðmiðanir fyrir ICE-flokkun á meðalgeymd flúrskinslausnar

Meðalstig flúrskinsgeymdar 30 mínútum eftir meðhöndlun (*)	ICE-flokkur
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Byggt á stigum eins og þau eru skilgreind í töflu 2.

Flokkun *í glasi* fyrir prófunaríðefni er metin með því að lesa flokkunina samkvæmt HSK, sem samsvarar samsettu undirflokkunum sem fram komu fyrir bólgu í glæru, ógagnsæi glæru og flúrskinsgeymd eins og lýst er í töflu 6.

Tafla 6

Heildarflokkun *í glasi*

Flokkun samkvæmt HSK SÞ	Samsetning endapunktanna þriggja
Utan flokka	3 × I 2 × I, 1 × II
Ekki er hægt að setja fram spá	Aðrar samsetningar
1. undirflokkur	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × II (*) Ógagnsæi glæru er ≥ 3 eftir 30 mín. (í a.m.k. tveimur augum) Ógagnsæi glæru = 4 á hvaða tímapunkti sem er (í a.m.k. tveimur augum) Mikið los á þekjunni (í a.m.k. einu auga)

(*) Samsetningar sem ólíklegra er að komi fram

Viðmiðanir fyrir samþykkt rannsóknar

Prófun telst samþykktarhæf ef samskeiða, neikvæður samanburður eða samanburður með burðarefni eða leysi og samskeiða, jákvæður samanburður er greindur utan flokka í HSK og í 1. undirflokk HSK, eftir því sem við á.

Prófunarskýrsla

Í prófunarskýrslunni skulu vera eftirfarandi upplýsingar ef þær skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar:

Prófunar- og samanburðaríðefni:

— efnaheiti, s.s. byggingarheiti sem Upplýsingaþjónustan um íðefni (CAS) notar, og þar á eftir önnur þekkt heiti,

— CAS-skráningarnúmer (CAS-nr.) ef það er þekkt,

— hreinleiki og samsetning prófunar-/samanburðaríðefna (í hundraðshlutum miðað við þyngd) að því marki sem þær upplýsingar eru tiltækar,

— eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, s.s. eðlisástand, rokgirni, sýrustig, stöðugleiki, efnaflokkur og vatnsleysni,

— meðhöndlun prófunar- og samanburðaríðefnanna fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun),

— stöðugleiki, ef hann er þekktur.

Upplýsingar um bakhjarl og prófunarstöð

— heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra,

— tilgreining á uppruna augnanna (þ.e. starfsstöðin þar sem þau voru tekin).

Skilyrði fyrir prófunaraðferðina

— lýsing á prófunarkerfinu sem er notað,

— raufarlampasmásjá sem er notuð (t.d. tegund) og tækjastillingar fyrir raufarlampasmásjána sem er notuð,

— tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir neikvæðan og jákvæðan samanburð og, ef við á, rannsóknarsöguleg gögn sem sýna viðunandi svið fyrir samskeiða viðmiðunarsamanburð,

— verklagið sem er notað til að tryggja heilleika (þ.e. nákvæmni og áreiðanleika) prófunaraðferðarinnar yfir tíma (t.d. reglubundin prófun á hæfnisíðefnum).

Söfnun og undirbúningur augna

— aldur og þyngd gjafadýrsins og aðrir tilteknir eiginleikar dýranna sem augun voru tekin úr (t.d. kyn, stofn) ef þær upplýsingar eru tiltækar,

— skilyrði við geymslu og flutning augnanna (t.d. dagur og stund þegar þau voru tekin, tímabilið milli töku kjúklingahausanna og þess að brottnumdu augunum voru sett í hólfið í yfirhellingarbúnaðinum),

— undirbúningur og uppsetning augnanna, þ.m.t. yfirlýsingar varðandi gæði þeirra, hitastig augnhólfa og viðmiðanir fyrir vali á augum sem eru notuð til prófunar.

Prófunaraðferð

— fjöldi samhliða sýna sem er notaður,

— einkenni neikvæða og jákvæða samanburðarins sem er notaður (ef við á, einnig leysissamanburðarins og viðmiðunarsamanburðarins),

— skammtur prófunaríðefnis, hvernig það er borið á og váhrifatími þess,

— athugunartímapunktar (fyrir og eftir meðferð),

— lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar,

— lýsing á viðmiðunum fyrir samþykkt rannsóknar sem eru notaðar,

— lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

Niðurstöður

— töflusetning stiga sem fást varðandi bólgu í glæru, ógagnsæi glæru og flúrskinsgeymd fyrir hvert auga og á hverjum athugunartíma, þ.m.t. meðalstig á hverjum athugunartíma allra prófunaraugna,

— hæsta meðalgildi fyrir bólgu í glæru, ógagnsæi glæru og flúrskinsgeymd sem mælist (á hvaða tímapunkti sem er) og viðkomandi ICE-flokkur,

— lýsing á öllum öðrum áhrifum sem verður vart,

— flokkunin skv. HSK leidd af prófun í glasi,

— ljósmyndir af auganu, ef við á.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Ályktun

HEIMILDIR:

1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Aðgengilegt á: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

6) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting.

7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

8) OECD (2011) Guidance Document on "The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants". Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Aðgengilegt á: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Aðgengilegt á: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Aðgengilegt á: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.*- 19, 471-480.'

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð.

Viðmiðunaríðefni: Íðefni sem er notað sem viðmiðunarstaðall fyrir prófunaríðefni. Viðmiðunaríðefni skal hafa eftirfarandi eiginleika, i) einsleitan og áreiðanlegan uppruna, ii) líkindi í byggingu og virkni við íðefnaflokkinn sem er verið að prófa, iii) þekkta eðlisfræðilega/efnafræðilega eiginleika, iv) stuðningsgögn um þekkt áhrif og v) þekktan mátt á sviði æskilegrar svörunar.

Neðansækin nálgun: Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir íðefni sem talið er að þurfi ekki flokkun m.t.t. augnertingar eða alvarlegs augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem þurfa ekki flokkun (neikvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (jákvæð niðurstaða).

Íðefni: Efni eða blanda.

Glæra: Gagnsær, fremsti hluti augans sem þekur lithimnuna og augasteininn og hleypir ljósi inn í augað.

Ógagnsæi glæru: Mæling á því að hvaða marki glæran verður ógagnsæ eftir váhrif frá prófunaríðefni. Aukið ógagnsæi glæru bendir til skemmda á henni.

Glærubólga: Hlutlæg mæling í ICE-prófuninni á því að hvaða marki glæran þenst út eftir váhrif frá prófunaríðefni. Hún er gefin upp sem hundraðshluti og er reiknuð út frá grunnviðmiðunarmælingum (áður en prófunarefni er borið á) á glæruþykkt og þykktinni sem er skráð með reglulegu millibili eftir váhrif frá prófunaríðefninu í ICE-prófuninni. Umfang bólgu í glæru er til marks um skemmdir á henni.

Augnerting: Breytingar, sem eiga sér stað í auga eftir að prófunaríðefni hefur verið borið á það, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags. Jafngildir „Afturhverf áhrif á augu“ og „2. undirflokkur HSK SÞ“ (4. heimild).

Falsneikvæðar niðurstöður: Hlutfall allra jákvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Falsjákvæðar niðurstöður: Hlutfall allra neikvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Flúrskinsgeymd: Huglæg mæling í ICE-prófuninni á geymd natríumflúrskinslausnar í þekjufrumum glærunnar eftir váhrif frá prófunarefni. Umfang flúrskinsgeymdar er til marks um skemmdir á glæruþekjunni.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur verður fyrir váhrifum frá því efni.

Varanleg áhrif á augu: sjá „Alvarlegur augnskaði“ og „1. undirflokkur HSK SÞ“.

Blanda: Tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í (4. heimild).

Neikvæður samanburður: Ómeðhöndlað, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum sem hafa verið meðhöndluð með prófunaríðefni, g öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn víxlverkar við prófunarkerfið.

Ekki flokkað: Efni sem eru ekki flokkuð m.t.t. augnertingar (2. undirflokkur HSK SÞ) eða alvarlegs augnskaða (1. undirflokkur HSK SÞ). Jafngildir „utan flokka í HSK SÞ“.

Jákvæður samanburður: Samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með íðefni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi mikla svörun þó ekki vera of kröftug.

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni.

Afturhverf áhrif á augu: sjá „Augnerting“ og „2. undirflokkur HSK SÞ“.

Alvarlegur augnskaði: Vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunaríðefni hefur verið borið framan á augað (2. heimild), sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá áburði. Jafngildir „Varanleg áhrif á augu“ og „1. undirflokkur HSK SÞ“ (4. heimild).

Raufarlampasmásjá: Tæki sem er notað til að rannsaka augað beint með stækkun í tvísæissmásjá sem skapar þrívíða, upprétta mynd. Í ICE-prófuninni er þetta tæki notað til að skoða fremri hluta kjúklingaaugna sem og til þess að mæla þykkt glærunnar hlutlægt með aukabúnaði sem mælir dýpt.

Samanburður með leysi eða burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og er unnið með sýnum sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu og með öðrum samanburðarsýnum til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða, neikvæðu samanburðarsýni sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Efni: Frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar og óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem hægt er að skilja frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess (4. heimild).

Yfirborðsvirkt efni: Efni, s.s. þvotta- og hreinsiefni, sem getur minnkað yfirborðsspennu vökva og gerir því þannig kleift að freyða eða ganga inn í fast efni; efnið er einnig þekkt sem blotefni.

Ofansækin nálgun: Þrepskipt aðferð sem er notuð fyrir íðefni sem talið er að valdi alvarlegum augnskaða sem hefst með því að skilja þau íðefni sem kalla fram alvarlegan augnskaða (jákvæð niðurstaða) frá öðrum íðefnum (neikvæð niðurstaða).

Prófunaríðefni: Sérhvert efni og blanda sem eru prófuð með þessari prófunaraðferð.

Stigskipt prófunaráætlun: Þrepskipt prófunaráætlun þar sem allar upplýsingar um prófunaríðefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SÞ): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (4. heimild).

1. undirflokkur HSK SÞ: sjá „Alvarlegur augnskaði“ og/eða „Varanleg áhrif á augu“.

2. undirflokkur HSK SÞ: sjá „Augnerting“ og/eða „Afturhverf áhrif á augu“.

Utan flokka í HSK SÞ: Efni sem uppfylla ekki kröfurnar varðandi flokkun í 1. eða 2. undirflokk HSK SÞ (2A eða 2B). Jafngildir „Ekki flokkað“.

Fullgilt prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nákvæm og áreiðanleg til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang.

Vægi rökstuddra vísbendinga: Ferli sem felst í því að vega og meta styrkleika og veikleika ýmissa upplýsinga til að komast að niðurstöðu um hugsanlega hættu af tilteknu íðefni og styðja þá niðurstöðu rökum.

———

2. viðbætir

HÆFNISÍÐEFNI FYRIR ICE-PRÓFUNARAÐFERÐINA

Áður en prófunaraðferð, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar ættu rannsóknarstofur að sýna fram á tæknilega hæfni með því að greina rétt hættuflokkun fyrir augu fyrir þau 13 íðefni sem eru ráðlögð í töflu 1. Þau efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið hættu fyrir augu samkvæmt niðurstöðum úr augnprófun í lífi á kanínum (TG 405) og flokkunarkerfi HSK SÞ (þ.e. 1. undirflokk HSK SÞ og 2A, 2B eða „Ekki flokkað“) (4. og 6. heimild). Aðrar valviðmiðanir voru að íðefnin fengjust á almennum markaði, að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í glasi fengin með ICE-prófunaraðferðinni. Tilvísunargögn er að finna í SSD (5. heimild) og „Background Review Document“ ICCVAM-nefndarinnar vegna ICE-prófunaraðferðarinnar (9. heimild).

Tafla 1

Íðefni sem eru ráðlögð til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir ICE-prófunaraðferðina

Íðefni	CAS-númer	Efnaflokkur (1)	Eðlisástand	*Í lífi*-flokkun (2)	*Í glasi*-flokkun (3)
Bensalkóníumklóríð (5%)	8001-54-5	Óníumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Klórhexidín	55-56-1	Amín, amidín	Fast efni	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Díbensóýl-L-vínsýra	2743-38-6	Karboxýlsýra, estri	Fast efni	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Imídasól	288-32-4	Heturhringað	Fast efni	1. undirflokkur	1. undirflokkur
Þríklórediksýra (30%)	76-03-9	Karboxýlsýra	Vökvi	1. undirflokkur	1. undirflokkur
2,6-díklórbensóýlklóríð	4659-45-4	Asýlhalíð	Vökvi	Undirflokkur 2A	Ekki er hægt að setja fram spá (4)
Ammóníumnítrat	6484-52-2	Ólífrænt salt	Fast efni	Undirflokkur 2A (5)	Ekki er hægt að setja fram spá (4)
Etýl-2-metýlasetóasetat	609-14-3	Ketón, estri	Vökvi	Undirflokkur 2B	Ekki er hægt að setja fram spá (4)
Dímetýlsúlfoxíð	67-68-5	Lífrænt brenni-steinssamband	Vökvi	Utan flokka	Utan flokka
Glýseról	56-81-5	Alkóhól	Vökvi	Utan flokka	Utan flokka (óviss flokkun)

Íðefni	CAS-númer	Efnaflokkur ([1])	Eðlisástand	*Í lífi*-flokkun ([2])	*Í glasi*-flokkun ([3])
Metýlsýklópentan	96-37-7	Vetniskolefni (hringað)	Vökvi	Utan flokka	Utan flokka
n-hexan	110-54-3	Vetniskolefni (keðjulaga)	Vökvi	Utan flokka	Utan flokka
Tríasetín	102-76-1	Fituefni	Vökvi	Ekki flokkað	Utan flokka

Skammstafanir: CAS-númer = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni.

([1]) Hverju prófunaríðefni var skipað í íðefnaflokk með því að nota staðlað flokkunarkerfi, byggt á flokkunarkerfi National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi á kanínuaugum (OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir) og með notkun hnattsamræmds kerfis Sameinuðu þjóðanna (4. og 6. heimild).

([3]) Byggt á niðurstöðum sem fást með ICE-prófun eins og lýst er í töflu 6.

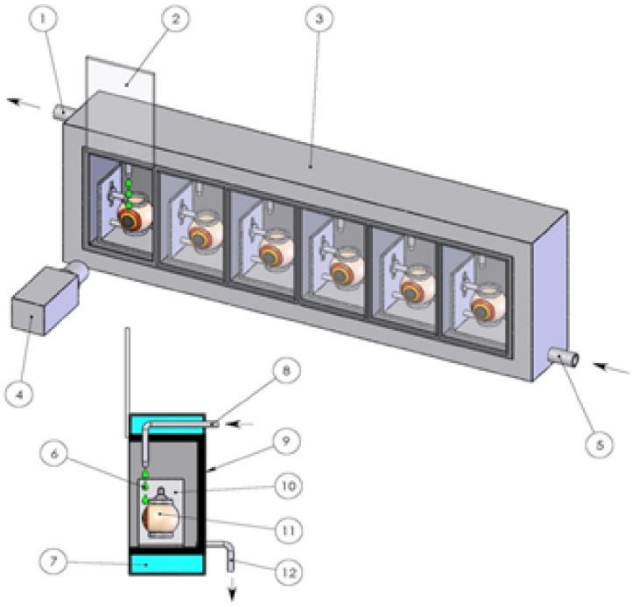
([4]) Samanlögð stig úr ICE-prófun önnur en þau sem lýst er í töflu 6 til greiningar utan flokka í HSK og í 1. undirflokk HSK (sjá töflu 6).

([5]) Flokkun í 2A eða 2B veltur á túlkun á viðmiðun HSK SÞ til að greina á milli þessara tveggja undirflokka, þ.e. eitt dýr af þremur á móti tvö dýr af þremur, sem sýna svörun á sjöunda degi, sem er nauðsynlegt til að gefa flokkun í undirflokk 2A. Í rannsókn í lífi eru notuð þrjú dýr. Allir endapunktar, fyrir utan roða í slímhimnu hjá einu dýri, sýndu bata að núll stigi á sjöunda degi eða fyrr. Dýrið sem náði ekki fullum bata fyrir sjöunda dag hafði roða í slímhimnu svo nam einu stigi (á sjöunda degi) en náði fullum bata á tíunda degi.

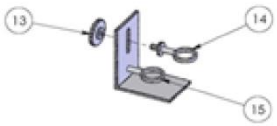
3. viðbætir

SKÝRINGARMYNDIR AF YFIRHELLINGARBÚNAÐI OG AUGNKLEMMUM FYRIR ICE-PRÓFUN

(Sjá Burton et al. (18. heimild) fyrir ítarlegri, almennar lýsingar á yfirhellingarbúnaði og augnklemmu)



ÞVERSNIÐ AF HÓLFI



HALDARI FYRIR AUGA

Nr. hlutar	Lýsing	Nr. hlutar	Lýsing
1	Frárás fyrir volgt vatn	9	Hólf
2	Rennihurð	10	Haldari fyrir auga
3	Yfirhellingarbúnaður	11	Auga úr kjúklingi
4	Augnmælitæki	12	Frárás fyrir saltlausn
5	Aðrás fyrir volgt vatn	13	Festiskrúfa
6	Saltlausn	14	Stillanlegur efri armur
7	Volgt vatn	15	Fastur neðri armur
8	Aðrás fyrir saltlausn		

14) Í stað kafla B.49 í B-hluta komi eftirfarandi:

„B.49 **Smákjarnaprófun í glasi á spendýrafrumum**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 473 um prófanir (2016).Hún er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Skjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar, sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á þessum viðmiðunarreglunum um prófanir (1. heimild), hefur verið þróað.

Smákjarnaprófun í glasi er prófun á erfðaeiturhrifum til að greina smákjarna í umfrymi í millifasa frumna. Smákjarnar geta átt uppruna sinn í brotum af óheftum litningum (þ.e. sem vantar þráðhaft) eða heilum litningum sem ná ekki að færast að skautunum í síðfasa frumuskiptingar. Því er smákjarnaprófun í glasi prófun sem myndar breiðan grundvöll undir rannsóknir í glasi á mættinum til litningaskemmda þar eð hægt er að greina bæði efni sem valda mislitnun og efni sem veldur litningabrenglun (2. og 3. heimild) í frumum sem hafa skipt sér á meðan á váhrifum frá prófunaríðefninu stóð eða eftir það (sjá 13. lið fyrir frekari upplýsingar). Smákjarnar sýna fram á skaða sem hefur flust áfram til dótturfrumna en litningabreytingar sem finnast í frumum í miðfasa flytjast ekki endilega áfram. Í báðum tilvikum geta breytingarnar skert lifun frumnanna.

Þessi prófunaraðferð gerir kleift að nota aðferðarlýsingar með og án aktín-fjölliðunarlatans sýtókalasíns-B. Ef sýtókalasíni-B er bætt við fyrir jafnskiptinguna verða frumurnar tvíkjarna og er því hægt að ákvarða og greina smákjarna í eingöngu þeim frumum sem hafa lokið einu jafnskiptingarferli (4. og 5. heimild). Þessi prófunaraðferð gerir einnig kleift að nota aðferðarlýsingar án hindrunar á umfrymisskiptingu, að því tilskildu að frumurnar í greiningarhópnum hafi skipt sér.

Auk þess að nota smákjarnaprófun í glasi til að greina íðefni sem framkalla smákjarna geta ónæmisefnafræðileg merking þráðhalda eða þáttatenging með þráðhafts- eða litningsendaþreifurum (flúrljómandi, staðbundin þáttatenging (FISH-tækni)) einnig veitt viðbótarupplýsingar um gangvirki litningaskemmda og myndun smákjarna (6.–17. heimild). Hægt er að nota aðferðirnar með merkingu og þáttatengingu ef það er aukning í smákjarnamyndun og rannsakandinn vill ákvarða hvort aukningin hafi verið af völdum atburða sem valda litningabrenglun og/eða sem valda mislitnun.

Þar eð hægt er að meta smákjarna í frumum í millifasa á tiltölulega hlutlægan hátt þarf starfsfólk rannsóknarstofa aðeins að ákvarða fjölda tvíkjarna frumna þegar sýtókalasín-B er notað og hlutfall smákjörnóttra frumna í öllum tilvikum. Þar af leiðandi er hægt að telja frekar hratt á sýnisglerjunum og hafa greininguna sjálfvirka. Það er því hagnýtt að telja þúsundir frumna í hverri meðhöndlun í stað hundraða frumna en það eykur styrk prófunarinnar. Þar eð smákjarnar geta orðið til út frá litningum sem sitja eftir er unnt að greina efni sem framkalla mislitnun og sem erfitt er að rannsaka í hefðbundnum prófunum á litningabreytingum, t.d. kafli B.10 í þessum viðauka (18. heimild). Smákjarnaprófun í glasi, eins og lýst er í þessari prófunaraðferð, gerir þó ekki kleift að greina íðefni sem framkalla breytingar í litningafjölda, og/eða litnun, frá þeim sem framkalla litningabrenglun, án sérstakra aðferða, s.s. flúrljómandi, staðbundinnar þáttapörunar sem nefnd er í 4. mgr.

Smákjarnaprófun í glasi er traust og má framkvæma fyrir margskonar frumugerðir, hvort sem sýtókalasín-B er notað eða ekki. Til eru viðtæk gögn sem styðja gildi smákjarnaprófunar í glasi þar sem notaðar eru margskonar frumugerðir (ræktir úr frumulínum eða ræktir með fyrsta stigs frumum) (19.–36. heimild). Meðal þeirra eru einkum alþjóðlegar fullgildingarrannsóknir samræmdar af „Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG)“ (19.–23. heimild) og skýrslur frá „International Workshop on Genotoxicity Testing“ (5. og 17. heimild). Fyrirliggjandi gögn hafa einnig verið endurmetin með afturskyggnri fullgildingarrannsókn á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga, sem Evrópumiðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) á vegum framkvæmdastjórnar Evrópusambandsins (EB) gerði, og vísindaleg ráðgjafarnefnd Evrópumiðstöðvarinnar hefur fallist á að prófunaraðferðin sé vísindalega gild (37.–39. heimild).

Smákjarnaprófunin í glasi á spendýrafrumum fer ýmist fram á ræktum með frumulínum eða ræktum með fyrsta stigs frumum upprunnum í mönnum eða nagdýrum. Þar eð bakgrunnstíðni smákjarna hefur áhrif á næmi prófunarinnar er mælt með því að nota frumugerðir sem hafa stöðuga og skilgreinda bakgrunnstíðni smákjarnamyndunar. Frumurnar, sem eru notaðar, eru valdar eftir því hvort þær vaxa vel í ræktum, eftir stöðugleika kjarngerðarinnar (þ.m.t. litningafjöldi) og því hve tíðir smákjarnar eru í þeim (40. heimild). Þau gögn sem nú eru fyrirliggjandi gefa ekki efni til sérstakra tilmæla en gefa til kynna að við mat á hættum af íðefni sé mikilvægt að skoða *p53* ástand, erfðafræðilegan (kjarngerðar) stöðugleika, DNA-viðgerðagetu og uppruna (nagdýr eða maður) frumnanna sem eru valdar í prófunina. Notendur þessarar prófunaraðferðar eru því hvattir til að skoða áhrif þessara og annarra eiginleika frumna á nothæfi frumulínu þegar greind er vakning smákjarna, eftir því sem þekking á þessu sviði þróast.

Skilgreiningar, sem eru notaðar, eru gefnar upp í 1. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun nema frumurnar hafi efnaskiptasvörun við íðefnin sem er verið að prófa. Útrænt kerfi efnaskiptavirkjunar getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim aðstæðum sem ríkja í lífi. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem gætu leitt til niðurstaðna sem eru jákvæðar vegna gervinga og endurspegla ekki erfðaeiturhrif prófunaríðefnanna. Meðal slíkra aðstæðna eru breytingar á sýrustigi (41.–43. heimild) eða osmólalstyrk, verkanir milli prófunaríðefnis og frumuræktunarmiðils (44. og 45. heimild) eða of mikil frumueiturhrif (sjá 29. lið).

Við greiningu á vakningu smákjarna þarf jafnskipting að hafa farið fram, bæði í meðhöndluðu og ómeðhöndluðu ræktunum. Það gefur mestar upplýsingar að telja smákjarna í frumum sem hafa lokið einni jafnskiptingu að fullu meðan á meðhöndlun með prófunaríðefninu stóð eða eftir hana. Sértækar aðlaganir á þessari prófunaraðferð eru nauðsynlegar vegna tilbúinna nanóefna en þeim er ekki lýst í þessari aðferð.

Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Frumuræktir, úr mönnum eða öðrum spendýrum, eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, bæði með og án útrænnar efnaskiptavirkjunar, nema notaðar séu frumur sem hafa fullnægjandi getu til efnaskiptavirkjunar (sjá 19. lið).

Frumurnar eru ræktaðar nógu lengi, meðan á váhrifum vegna prófunaríðefnisins stendur eða eftir þau, til að skemmdir á litningum eða önnur áhrif á frumuhring/frumuskiptingu leiði til myndunar smákjarna í frumum í millifasa. Að öllu jöfnu skal prófunaríðefnið vera fyrir hendi meðan á jafnskiptingu stendur ef það á að vekja mislitnun. Litaðar frumur í millifasa eru heimtar og greint hvort í þeim séu smákjarnar. Best er að telja aðeins smákjarna í þeim frumum sem luku jafnskiptingu að fullu meðan á váhrifum frá prófunaríðefninu stóð eða á tímabilinu að lokinni meðhöndlun, ef það tímabil er notað. Í ræktum, sem hafa verið meðhöndlaðar með hindrun á umfrymisskiptingu, er þessu náð fram auðveldlega með því að telja aðeins frumur sem eru tvíkjarna. Ef ekki er notuð hindrun á umfrymisskiptingu er mikilvægt að sýna fram á líklegt sé að frumurnar, sem eru greindar, hafi skipt sér, á grundvelli aukningar í frumuhópnum, meðan á váhrifum frá prófunaríðefninu stóð eða eftir þau. Mikilvægt er að sýna fram á, í öllum aðferðarlýsingum, að frumufjölgun hafi orðið bæði í samanburðarræktunum og meðhöndluðu ræktunum og það skal metið í öllum ræktunum, sem smákjarnar eru taldir í, að hvaða marki prófunaríðefnið hafi framkallað frumueiturhrif eða frumuhamningu.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Frumur

Nota má eitilfrumur, sem eru ræktaðar beint úr útæðablóði manns eða annarra spendýra (7., 20., 46. og 47. heimild), og ýmsar nagdýrafrumulínur, s.s. CHO, V79, CHL/IU og L5178Y eða frumulínur úr mönnum, s.s. TK6 (19.–23., 26.–29., 31. og 33.–36. heimild) (sjá 6. lið). Notaðar hafa verið aðrar frumulínur, s.s. HT29 (48. heimild), Caco-2 (49. heimild), HepaRG (50. og 51. heimild), HepG2-frumur (52, og 53. heimild), A549 og fyrsta stigs fósturfrumur úr gullhamstri (54. heimild) í smákjarnaprófun en hafa eins og er ekki fengið víðtæka fullgildingu. Rökstuðningur fyrir notkun á þeim frumulínum og frumugerðum skal því byggjast á nothæfi þeirra, sem sýnt er fram á í prófuninni, eins og lýst er í þættinum um viðmiðanir fyrir ásættanleika. Greint var frá hugsanlegum áhrifum sýtókalasíns B á frumuvöxt í L5178Y og er af þessum sökum ekki mælt með því fyrir þá frumulínu (23. heimild). Af ástæðum er varða velferð dýra skal nota frumur sem eru upprunnar í mönnum, ef það er gerlegt og ef notaðar eru fyrsta stigs frumur, og þær teknar í samræmi við siðferðislegar meginreglur og reglusetningu fyrir menn.

Eitilfrumur úr útæðablóði manns skulu fengnar úr ungum einstaklingum (u.þ.b. 18–35 ára) sem reykja ekki og sem ekki er vitað til að séu haldnir sjúkdómum eða hafi nýlega orðið fyrir váhrifum frá efnum sem valda erfðaeiturhrifum (t.d. íðefnum, jónandi geislun) í styrk sem myndi auka bakgrunnstíðni smákjörnóttra frumna. Það myndi tryggja að bakgrunnstíðni smákjörnóttra frumna yrði lág og jöfn. Grunntíðni smákjörnóttra frumna eykst með aldri og sú leitni er meira áberandi hjá konum en körlum (55. heimild). Ef frumur úr fleiri en einum gjafa eru hópaðar fyrir notkun skal tilgreina fjölda gjafanna. Það er nauðsynlegt að sýna fram á að frumurnar hafi skipt sér frá upphafi meðhöndlunarinnar með prófunaríðefninu og að töku þeirra í sýni. Þar sem næmni frumustiganna fyrir prófunaríðefninu er hugsanlega ekki þekkt er frumuræktum haldið í veldisvaxtarfasa (frumulínur) eða þær örvaðar til að skipta sér (fyrsta stigs ræktir eitilfrumna) til að frumurnar verði fyrir váhrifum á mismunandi stigum frumuhringsins. Fyrsta stigs frumurnar sem þurfa jafnskiptingarörvunarefni til að skipta sér eru yfirleitt hættar að vera samstilltar meðan á váhrifunum af prófunaríðefninu stendur (t.d. eitilfrumur úr mönnum 48 klukkustundum eftir örvun jafnskiptingar). Ekki er mælt með að nota samstilltar frumur meðan á meðhöndlun með prófunaríðefninu stendur en það er þó ásættanlegt ef það er stutt rökum.

Miðill og ræktunarskilyrði

Til að viðhalda frumuræktum skal nota viðeigandi ræktunarmiðil og skilyrði við viðstöðu (e. *incubation condition*) (ræktunarílát, rakabætt andrúmsloft með 5% CO_2 ef við á, 37 °C hiti). Fylgjast skal að staðaldri með frumulínum til að ganga úr skugga um að dæmigerður litningafjöldi sé stöðugur og að ekki sé um berfrymingasmit að ræða og ekki skal nota frumur með slíku smiti eða ef dæmigerður litningafjöldi hefur breyst. Nauðsynlegt er að vita hver er eðlileg lengd frumuhrings frumulína eða fyrsta stigs frumna sem eru notaðar í prófunarstofunni og hún skal vera í samræmi við útgefnu frumueiginleikana.

Undirbúningur rækta

Frumulínur: frumum úr stofnræktum er fjölgað, sáð í ræktunarmiðil í hæfilegum þéttleika til að frumur í sviflausnum eða einlögum haldi áfram í veldisvexti þar til þær eru heimtar (t.d. ætti að forðast samrennsli frumna sem vaxa í einlögum).

Eitilfrumur: heilblóð, sem er meðhöndlað með segavarnarefni (t.d. heparíni), eða stakar eitilfrumur eru ræktaðar (t.d. 48 stundir ef það eru eitilfrumur úr mönnum) að viðbættum jafnskiptingarræsi, (t.d. fýtóhemaglútíníni (PHA) fyrir eitilfrumur úr mönnum), til að framkalla frumuskiptingu áður en kemur að váhrifum frá prófunaríðefninu og sýtókalasíni-B.

Efnaskiptavirkjun

Nota skal útræn efnaskiptakerfi þegar notaðar eru frumur sem hafa ófullnægjandi getu til útrænna efnaskipta. Algengast er að nota kerfi, sem er sjálfgefið hið ráðlagða nema rök séu færð fyrir öðru kerfi, með hvatberasneyddum frumusafa (hér á eftir „S9“) með viðbættum hjálparþætti sem er unninn úr nagdýralifur (yfirleitt úr rottum) og meðhöndlaður með ensímörvandi efnum, s.s. Aroclor 1254 (56. og 57. heimild) eða blöndu fenóbarbítals og β-naptóflavóns (58.–60. heimild). Síðarnefnda samsetningin stríðir ekki gegn Stokkhólmssamningnum um þrávirk lífræn efni (61. heimild) og sýnt hefur verið fram á að hún sé jafn árangursrík og Aroclor 1254 til að framkalla oxídasa sem gegna mismunandi hlutverki (58.–60. heimild). S9-þátturinn er venjulega notaður í styrkleika sem er frá 1 til 2% að rúmmálshlutfalli en má auka upp í 10% í síðasta prófunarmiðlinum. Varast skal notkun vara sem lækka jafnskiptingarhlutfallið meðan á meðhöndlun stendur, einkum vörur með efnum sem mynda kalsíumflóka (62. heimild). Flokkur íðefnanna sem verið er að prófa getur haft áhrif á valið á tegund og styrk útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins eða efnaskiptavakans sem er notaður.

Tilreiðsla prófunaríðefnis

Íðefni í föstu formi skulu tilreidd í viðeigandi leysum og þynnt, ef við á, áður en frumurnar eru meðhöndlaðar. Fljótandi prófunaríðefni má setja beint út í prófunarkerfið og/eða þynna þau fyrir meðferðina í prófunarkerfinu. Lofttegundir eða rokgjörn prófunaríðefni skulu prófuð með viðeigandi breytingum á stöðluðu aðferðarlýsingunum, s.s. meðhöndlun í innsigluðum ílátum (63.–65. heimild). Blöndur af prófunaríðefni skulu gerðar rétt fyrir meðhöndlun nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

Prófunarskilyrði

Leysar

Leysirinn skal valinn til að besta leysni prófunaríðefna án þess að hafa neikvæð áhrif á framkvæmd prófunar, þ.e. með breytingu á frumuvexti, áhrifum á heilleika prófunaríðefnisins, efnahvörfum við ræktunarílát, hindrun efnaskiptavirkjunarkerfisins. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi (eða ræktunarmiðil). Vel þekktir leysar eru vatn eða dímetýlsúlfoxíð (DMSO). Almennt ættu lífrænir leysar ekki fara yfir 1% (rúmmálshlutfall). Ef sýtókalasín-B er leyst upp í dímetýlsúlfoxíði ætti heildarmagn lífræns leysis, sem notaður er bæði fyrir prófunaríðefnið og sýtókalasín-B, ekki fara yfir 1% (rúmmálshlutfall), annars ætti að nota ómeðhöndlaða samanburði til að tryggja að hlutfall lífræns leysis hafi ekki skaðleg áhrif. Vatnskenndir leysar (saltvatn eða vatn) ættu ekki fara yfir 10% (rúmmálshlutfall) í endanlega meðhöndlunarmiðlinum. Ef notaðir eru aðrir leysar en þeir vel þekktu (t.d. etanól eða aseton) skal notkun þeirra studd gögnum sem sýna að þau séu samrýmanleg við prófunaríðefnið og prófunarkerfið og hafi ekki erfðaeiturhrif við styrkleikann sem er notaður. Ef ekki liggja fyrir gögn til stuðnings því er mikilvægt að hafa ómeðhöndlaðan samanburð með (sjá 1. viðbæti) sem og samanburð með leysi til að sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, veki ekki skaðleg áhrif eða áhrif á litninga (s.s. mislitnun eða litningabrenglun).

Notkun sýtókalasíns-B til að hindra umfrymisskiptingu

Einn mikilvægasti þátturinn í framkvæmd smákjarnaprófunarinnar í glasi er að tryggja að frumurnar, sem er talið í, hafi lokið jafnskiptingu að fullu meðan á meðhöndluninni stóð eða, ef um það er að ræða, á viðstöðutímabilinu eftir meðhöndlun. Því ætti að takmarka talningu á smákjörnum við frumur sem hafa lokið jafnskiptingu meðan á meðhöndlun stóð eða eftir hana. Sýtókalasín-B er efnið sem er mest notað til að hindra umfrymisskiptingu vegna þess að það letur samsöfnun aktíns og kemur þannig í veg fyrir aðskilnað dótturfrumna eftir jafnskiptingu, sem aftur hefur í för með sér myndun tvíkjarna frumna (6., 66. og 67. heimild). Hægt er að mæla áhrif prófunaríðefnisins á hvarfafræði frumufjölgunar um leið ef sýtókalasín-B er notað. Ef eitilfrumur úr mönnum eru notaðar skal nota sýtókalasín-B til að hindra umfrymisskiptingu vegna þess að lengd frumuhringja er breytileg milli gjafa og vegna þess að eitilfrumur bregðast ekki allar við örvun með fýtóhemaglútíníni. Ekki er skylt að nota sýtókalasín-B fyrir aðrar frumugerðir ef hægt er að sýna fram á að þær hafi skipt sér eins og lýst er í 27. lið. Auk þess er sýtókalasín-B almennt ekki notað þegar sýni eru rannsökuð með tilliti til smákjarna með því að nota aðferðir með frumuflæðissjárgreiningu.

Rannsóknarstofan skal ákvarða viðeigandi styrk sýtókalasíns-B fyrir hverja frumugerð til að ná fram kjörtíðni tvíkjarna frumna í samanburðarræktinni með leysinum og sýnt skal fram á að með honum fáist nóg af tvíkjarna frumum til talningar. Viðeigandi styrkur sýtókalasíns-B er að jafnaði milli 3 og 6 μg/ml (19. heimild).

Mælingar á frumufjölgun og frumueiturhrifum og val á meðhöndlunarstyrk

Þegar hæsti styrkur íðefnis í prófun er ákvarðaður skal forðast styrk sem getur valdið svörun sem er jákvæð vegna gervinga, s.s. styrk sem veldur óhóflegum frumueiturhrifum (sjá 29. lið), útfellingu í ræktunarmiðlinum (sjá 30. lið) eða greinilegum breytingum á sýrustigi eða osmólalstyrk (sjá 9. lið). Ef prófunaríðefni veldur greinilegri breytingu á sýrustigi í miðlinum þegar því er bætt í hann skal stilla sýrustigið með því að jafna endanlega meðhöndlunarmiðilinn þannig að það komi í veg fyrir niðurstöðu sem er jákvæð vegna gervinga og til að viðhalda viðeigandi ræktunarskilyrðum.

Gerðar eru mælingar á frumufjölgun til að tryggja að nægilega meðhöndluðu frumurnar hafi lokið jafnskiptingu meðan á prófuninni stóð og að meðhöndlun fari fram við viðeigandi styrk frumueiturhrifa (sjá 29. lið). Frumueiturhrif skulu ákvörðuð með efnaskiptavirkjun og án hennar í aðaltilrauninni og þar skal styðjast við viðeigandi vísbendingar um frumudauða og frumuvöxt (sjá 26. og 27. lið). Ekki er skyldubundið að gera upphafsprófun en þó getur mat á frumueiturhrifum í upphafsforprófun verið gagnlegt við skilgreiningu á styrkleikunum sem á að nota í aðaltilrauninni. Ef hún er gerð kemur hún ekki í staðinn fyrir mælingarnar á frumueiturhrifum í aðaltilrauninni.

Meðhöndlun með sýtókalasíni-B og mælingar á hlutfallslegri tíðni einkjarna, tvíkjarna og margkjarna frumna í ræktinni er nákvæm aðferð við magngreiningu á áhrifum á frumufjölgun og frumueiturhrif eða frumuhemjandi virkni meðhöndlunar (6. heimild) og tryggir að aðeins er talið með smásjá í frumum sem hafa skipt sér meðan á meðhöndlun stóð eða eftir hana. Mælt er með fjölgunarstuðli fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í (CBPI) (6., 27. og 68. heimild) eða eftirmyndunarstuðli (RI) úr að lágmarki 500 frumum úr hverri rækt (sjá formúlur í 2. viðbæti) til að áætla frumueiturhrif og frumuhemjandi áhrif meðhöndlunar með því að bera saman gildin í meðhöndluðum ræktum og samanburðarræktum. Mat á öðrum vísum um frumueiturhrif (t.d. heilleiki frumna, stýrður frumudauði, drep, talning á frumum í miðfasa, frumuhringur) getur veitt gagnlegar upplýsingar en ætti ekki að nota í staðinn fyrir fjölgunarstuðul fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í eða eftirmyndunarstuðul.

Í rannsóknum, þar sem sýtókalasín-B er ekki notað, er nauðsynlegt að sýna fram á að frumurnar í ræktinni hafi skipt sér til að umtalsverður hluti talinna frumna hafi skipt sér meðan á meðhöndluninni með prófunaríðefninu stóð eða eftir hana því að annars geta niðurstöðurnar orðið falsneikvæðar. Mælt er með mælingu RPD (RPD) eða hlutfallslegrar hækkunar frumutölu (RICC) til að meta frumueiturhrif og frumuhemjandi áhrif meðhöndlunar (17., 68.–71. heimild) (sjá formúlur í 2. viðbæti). Hlutfallsleg tvöföldun hóps getur verið vanmat á frumueiturhrifum við framlengdan sýnatökutíma (t.d. meðhöndlun í tíma, sem jafngildir lengd eins og hálfs til tveggja eðlilegra frumuhringja, og heimt eftir lengd eins og hálfs til tveggja eðlilegra frumuhringja til viðbótar, sem leiðir til sýnatökutíma sem er lengri en þrír til fjórir eðlilegir frumuhringir í heild, eins og lýst er í 38. og 39. lið) (71. heimild). Hlutfallsleg hækkun frumutölu gæti verið betri mælikvarði við þær kringumstæður eða mat á frumueiturhrifum eftir eina og hálfa til tvær eðlilegar frumuhringslengdir verið gagnlegt. Mat á öðrum merkjum um frumueiturhrif eða frumuhamningu (t.d. heilleiki frumna, stýrður frumudauði, drep, talning á frumum í miðfasa, fjölgunarstuðull (PI), frumuhringur, kjarnafrymisbrýr (e. *nucleoplasmic bridges*) eða kjarnahnappar (e. *nuclear buds*)) getur veitt gagnlegar upplýsingar, en ætti ekki að nota í staðinn fyrir hlutfallslega tvöföldun hóps eða hlutfallslega hækkun frumutölu.

Meta skal a.m.k. þrjá prófunarstyrkleika (fyrir utan leysinn og jákvæðu samanburðina) sem uppfylla viðmiðanirnar fyrir ásættanleika (viðeigandi frumueiturhrif, frumufjölda o.s.frv.). Hver sem gerð frumnanna er (frumulínur eða fyrsta stigs ræktir eitilfrumna) er hægt að nota annað hvort stakar meðhöndlaðar ræktir eða margar samhliða fyrir hvern styrkleika sem er prófaður. Þótt ráðlagt sé að nota tvíteknar ræktir eru stakar ræktir líka ásættanlegar að því tilskildu að talinn heildarfjöldi frumna sé sá sami, bæði í stökum ræktum og tvíteknum ræktum. Það skiptir sérstaklega miklu máli að nota stakar ræktir ef metnir eru fleiri en þrír styrkleikar (sjá 44.-45. lið). Niðurstöðurnar sem fást úr óháðu samhliða ræktununum við tiltekinn styrkleika er hægt að hópa fyrir gagnagreininguna. Yfirleitt er hæfilegt að tvö- til þrefalda styrkbilin fyrir prófunaríðefni sem sýna lítil eða engin frumueiturhrif. Ef frumueiturhrif verða skal prófunarstyrkurinn, sem er valinn, ná frá sviði sem veldur frumueiturhrifum, eins og lýst er í 29. lið, og ná yfir styrkleika sem valda miðlungi til lítilla eða engra frumueiturhrifa. Mörg prófunaríðefni sýna brattan feril styrkháðrar svörunar og til að fá gögn yfir lág og miðlungs frumueiturhrif, eða til að rannsaka styrkháða svörun ítarlega, er nauðsynlegt að hafa minna bil á milli styrkleika og/eða fleiri en þrjá styrkleika (í stökum ræktum eða samhliða), einkum við þau skilyrði að endurtekin rannsókn er nauðsynleg (sjá 60. lið).

Ef hámarksstyrkurinn grundvallast á frumueiturhrifum ætti hæsti styrkurinn að miða að því að ná 55 ± 5% eiturhrifum, metnum með ráðlögðu mælikvörðunum á frumueiturhrifum (þ.e. lækkun hlutfallslegrar hækkunar frumutölu og hlutfallslegrar tvöföldunar hóps fyrir frumulínur þegar sýtókalasín-B er ekki notað og lækkun fjölgunarstuðuls fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í eða eftirmyndunarstuðuls þegar sýtókalasín-B er notað, í 45 ± 5% af samskeiða neikvæða samanburðinum) (72. heimild). Fara skal gætilega við túlkun á jákvæðum niðurstöðum sem koma aðeins fram í hærri enda þessa 55 ± 5% frumueiturhrifasviðs (71. heimild).

Hæsti, greindi styrkleiki torleysanlegra prófunaríðefna, sem hafa ekki frumueiturhrif í styrkleika sem er minni en lægstu leysanleikamörk, á að framkalla grugg eða botnfall sem er greinilegt með berum augum, eða með að nota umhverfða smásjá, við lok meðhöndlunarinnar með prófunaríðefninu. Þótt frumueiturhrif komi fram í styrkleika sem er hærri en lægstu leysanleikamörk er ráðlagt að prófa við einungis einn styrkleika sem framkallar grugg, eða sýnilegt botnfall, þar eð fellingin getur valdið niðurstöðum sem eru jákvæðar vegna gervinga. Við styrkleikann sem framkallar fellingu skal gætt að því að fellingin trufli ekki framkvæmd prófunarinnar (t.d. litunar eða talningu). Það getur verið gagnlegt að ákvarða leysnina í ræktunarmiðlinum fyrir tilraunina.

Ef hvorki koma fram felling né takmarkandi frumueiturhrif skal hæsti prófunarstyrkur samsvara 10 mM, 2 mg/ml eða 2 µl/ml, eftir því hvort er lægra (73.–75. heimild). Ef prófunaríðefnið hefur óskilgreinda samsetningu, t.d. efni með óþekkta eða breytilega samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni (UVCB-efni) (76. heimild), útdráttarefni úr umhverfinu o.s.frv., gæti hæsti styrkleikinn þurft að vera hærri (t.d. 5 mg/ml), ef frumueiturhrifin eru ónóg, til að auka styrk hvers og eins af efnisþáttunum. Þó skal þess getið að þessar kröfur geta verið frábrugðnar fyrir lyf handa mönnum (93. heimild).

Samanburðir

Í hvert sinn sem frumur eru heimtar skal hafa með samskeiða neikvæðan samanburð (sjá 21. lið), sem byggist á því að í meðhöndlunarmiðlinum er eingöngu leysir, sem farið er eins með og meðhöndluðu ræktirnar.

Samskeiða jákvæðir samanburðir eru nauðsynlegir til að sýna fram á getu rannsóknarstofunnar til að greina efni sem valda litningabrenglun og mislitnun við þau skilyrði sem tiltekin eru í aðferðarlýsingu prófunarinnar sem er notuð, og skilvirkni útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins (ef það á við). Dæmi um jákvæða samanburði eru gefin í töflu 1 hér á eftir. Hægt er að nota önnur jákvæð samanburðaríðefni ef það er stutt rökum.

Eins og sakir standa er ekki vitað um efni sem valda mislitnun og þurfa efnaskiptavirkjun fyrir erfðaeiturhrifavirkni sína (17. heimild). Þar eð prófanir í glasi á erfðaeiturhrifum á spendýrafrumur eru nægilega staðlaðar fyrir skammtímameðhöndlun sem gerð er samskeiða, með og án efnaskiptavirkjunar, með sömu lengd meðferðar, má takmarka notkun jákvæðs samanburðar við efni sem veldur litningabrenglun sem krefst efnaskiptavirkjunar. Í því tilviki sýnir ein litningabrenglandi svörun með jákvæðri samanburðarprófun fram á bæði virkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og svörunargetu prófunarkerfisins. Langtímameðhöndlun (án S9-þáttarins) ætti þó að hafa eigin jákvæðan samanburð þar eð meðhöndlunarlengdin er önnur en í prófuninni þar sem notuð er efnaskiptavirkjun. Ef efni sem veldur litningabrenglun er valið sem eini jákvæði samanburðurinn fyrir skammtímameðhöndlun, með og án efnaskiptavirkjunar, ætti að velja mislitnunarvaldandi efni fyrir langtímameðhöndlunina án efnaskiptavirkjunar. Nota skal jákvæðan samanburð, bæði fyrir litningabrenglandi og mislitnunarvaldandi efni, í frumum sem hafa efnaskiptasvörun og þarfnast ekki S9.

Í hverjum jákvæðum samanburði skal nota einn eða fleiri styrkleika sem vænst er að valdi samanburðarnákvæmri og greinanlegri aukningu miðað við bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi prófunarkerfisins (þ.e. áhrifin eru greinileg en sýna lesaranum ekki strax auðkenni kóðuðu sýnisglerjanna) og svöruninni skal ekki stefnt í hættu með frumueiturhrifum sem fara yfir mörkin sem eru tilgreind í prófunaraðferðinni.

Tafla 1

Viðmiðunaríðefni sem er mælt með til mats á hæfni rannsóknarstofu og við val á jákvæðum samanburði

Flokkur	Íðefni	CAS-númer
1. **Efni sem valda litningabrenglun og eru virk án efnaskiptavirkjunar**		
	Metýlmetansúlfónat	66-27-3
	Mítómýsín C	50-07-7
	4-nítrókínólín-N-oxíð	56-57-5
	Sýtósínarabínósíð	147-94-4
2. **Efni sem valda litningabrenglun og þarfnast efnaskiptavirkjunar**		
	Bensó(a)pýren	50-32-8
	Sýklófosfamíð	50-18-0

Flokkur	Íðefni	CAS-númer
3. **Efni sem valda mislitnun**		
	Kolsisín	64-86-8
	Vínblastín	143-67-9

VERKFERLI

Áætlun um meðhöndlun

Það er mikilvægt að meðhöndla nægilegan fjölda frumna á öllum stigum frumuhrings þeirra með prófunaríðefninu til þess að hámarka líkurnar á að greina efni sem veldur mislitnun eða efni sem veldur litningabrenglun á tilteknu stigi í frumuhringnum. Hefja skal og ljúka allri meðhöndlun meðan frumurnar eru í veldisvexti og ættu frumurnar að halda áfram að vaxa þar til sýnataka fer fram. Meðhöndlunaráætlunin fyrir frumulínur og ræktir með fyrsta stigs frumum getur því verið öðruvísi en áætlunin fyrir eitilfrumur sem þurfa jafnskiptingarörvun til að hefja frumuhring sinn (17. heimild). Ef um er að ræða eitilfrumur er skilvirkasta aðferðin að hefja meðhöndlun með prófunaríðefninu 44–48 klst. eftir örvun með fýtóhemaglútíníni, þegar frumur fara að skipta sér ósamhæft (6. heimild.)

Birt gögn (19. heimild) benda til þess að flest efni, sem valda mislitnun og litningabrenglun, greinist með stuttri meðhöndlun sem varir í 3–6 klukkustundir, með eða án S9, síðan er prófunaríðefnið fjarlægt og sýni tekið á tíma sem jafngildir lengd eins og hálfs til tveggja eðlilegra frumuhringja eftir upphaf meðhöndlunar (7. heimild).

Fyrir nákvæmt mat, en það er nauðsynlegt til að álykta að niðurstaðan sé neikvæð, skulu þó öll þrenn eftirfarandi tilraunaskilyrði notuð, með stuttri meðhöndlun með og án efnaskiptavirkjunar og langtímameðhöndlun án efnaskiptavirkjunar (sjá 56.–58. lið):

— Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, án efnaskiptavirkjunar, í 3–6 klst. og sýni tekið úr þeim eftir að tími, sem jafngildir lengd eins og hálfs til tveggja eðlilegra frumuhringja, er liðinn frá upphafi meðhöndlunar (19. heimild).

— Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu, án efnaskiptavirkjunar, í 3–6 klst. og sýni tekið úr þeim eftir að tími, sem jafngildir lengd eins og hálfs til tveggja eðlilegra frumuhringja, er liðinn frá upphafi meðhöndlunar (19. heimild).

— Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum stanslaust án efnaskiptavirkjunar þar til sýni er tekið úr þeim eftir tíma sem jafngildir lengd eins og hálfs til tveggja eðlilegra frumuhringja.

Ef eitthvert af framangreindum tilraunaskilyrðum veldur jákvæðri svörun gæti verið ónauðsynlegt að kanna hin meðhöndlunarkerfin.

Ef vitað er, eða grunur leikur á um, að prófunaríðefnið hafi áhrif á lengd frumuhrings (t.d. þegar verið er að prófa kirnisleifahliðstæður), einkum fyrir p53-virkjanlegar frumur (35., 36. og 77. heimild), má framlengja sýnatöku- eða endurheimtartíma um allt að eina og hálfa til tvær eðlilegar frumuhringjalengdir, (þ.e. lengd þriggja til fjögurra frumuhringja í heild eftir upphaf skammtíma- og langtímameðhöndlunar). Með þeim valkostum er tekist á við aðstæður þar sem hugsanlegar víxlverkanir milli prófunaríðefnisins og sýtókalasíns-B kunna að valda áhyggjum. Þegar sýnatökutíminn er framlengdur (þ.e. ræktunartími sem nemur lengd þriggja til fjögurra frumuhringja) skal gæta þess að tryggja að frumurnar séu enn virkar og skipti sér. Til dæmis getur veldisvöxtur í eitilfrumum verið farinn að minnka 96 klukkustundum eftir örvun og einlaga ræktir frumna geta orðið samfelldar.

Ráðlagðar áætlanir um meðhöndlun eru teknar saman í töflu 2. Heimilt er að breyta (með rökstuðningi) þessum almennu áætlunum um meðhöndlun eftir stöðugleika eða hvarfgirni prófunaríðefnisins eða tilteknum vaxtareiginleikum frumnanna sem eru notaðar.

Tafla 2

Tímasetningar meðhöndlunar og heimtar á frumum fyrir smákjarnaprófun í glasi

Eitilfrumur, fyrsta stigs frumur og frumulínur, meðhöndlaðar með sýtókalasíni-B	+ S9 Stutt meðhöndlun	Meðhöndlaðar í 3–6 klst., að viðbættum S9, S9 og meðhöndlunarmiðillinn eru fjarlægð, nýjum miðli og sýtókalasíni-B er bætt í, heimtar einni og hálfri til tveimur eðlilegum frumuhringslengdum eftir upphaf meðhöndlunar.
	– S9 Stutt meðhöndlun	Meðhöndlaðar í 3–6 klst., meðhöndlunarmiðillinn er fjarlægður, nýjum miðli og sýtókalasíni-B er bætt í, heimtar einni og hálfri til tveimur eðlilegum frumuhringslengdum eftir upphaf meðhöndlunar.
	– S9 Framlengd meðhöndlun	Meðhöndlaðar í sem nemur lengd 1,5–2 eðlilegra frumuhringja, að viðbættu sýtókalasíni-B, heimtar við lok meðhöndlunartímabilsins.
Frumulínur sem eru meðhöndlaðar án sýtókalasíns-B (Eins og áætlanirnar um meðhöndlun sem lýst er hér að framan nema að því leyti að engu sýtókalasíni-B er bætt í)		

Frumur í jafnskiptingu (þekkjast á því að þær eru hringlaga og losa sig frá yfirborðinu) geta verið til staðar í einlaga ræktum við lok 3–6 klst. meðhöndlunarinnar. Þar eð þessar frumur í jafnskiptingu losna auðveldlega geta þær glatast þegar miðillinn með prófunaríðefninu er fjarlægður. Ef það eru merki um að fjöldi frumna í jafnskiptingu aukist verulega miðað við samanburðarprófanirnar, sem er vísbending um stöðvaða jafnskiptingu, skal safna frumunum með skiljun og bæta þeim aftur í ræktina til að koma í veg fyrir að við heimtur glatist frumur sem eru í jafnskiptingu og hættu á myndun smákjarna/litningabreytingum.

Heimt frumna og undirbúningur sýnisglerja

Hver rækt skal heimt og unnin sér. Undirbúningur frumna getur falið í sér meðhöndlun í undirþrýstinni lausn en það stig er ekki nauðsynlegt ef fullnægjandi dreifing frumna næst með öðrum hætti. Nota má mismunandi aðferðir við undirbúning sýnisglerja, að því tilskildu að með þeim náist frumusýni af háum gæðum til talningar. Frumum með óskaddaða frumuhimnu og óskaddað umfrymi skal haldið eftir til að unnt sé að greina smákjarna og (ef notuð er hindrun á umfrymisskiptingu) greina tvíkjarna frumur á áreiðanlegan hátt.

Hægt er að lita sýnisglerin með mismunandi aðferðum, s.s. Giemsa-litun eða litun með DNA-sértækum flúrlitum. Ef notaðir eru viðeigandi flúrljómunarlitir (t.d. akridínappelsínugult (78. heimild) eða Hoechst 33258 með pýróníni-Y (79. heimild)) má komast hjá sumum gervingum sem komið geta fram ef notaðir eru litir sem eru ekki DNA-sértækir. Nota má þráðhaldsmótefni, flúrljómandi, staðbundna þáttapörun með þráðhaftsþreifara sem nær yfir allt þráðhaftið eða staðbundna merkingu með sértækum þráðhaftsvísum sem nær yfir allt þráðhaftið, ásamt viðeigandi DNA andstæðulitun til að greina innihald smákjarna (heilir litningar litast en óheft litningabrot ekki) ef upplýsingar um gangvirkið í myndun þeirra eru gagnlegar (16. og 17. heimild). Nota má aðrar aðferðir til að greina á milli efna sem valda litningabrenglun og efna sem valda mislitnun ef sýnt hefur verið fram á að þær séu árangursríkar og fullgiltar. Sem dæmi á það við um ákveðnar frumulínur að mælingar á kjörnum sem eru minna en tvílitna (sub-2N) sem atburði sem er til merkis um vantvílitnun (e. *hypodipoid event*) með notkun tækni, s.s. myndgreiningu, frumumælingu með leysigeislaskönnun eða frumuflæðissmásjárgreiningu, einnig veitt gagnlegar upplýsingar (80.–82. heimild). Formfræðilegar athuganir á kjörnum geta einnig gefið vísbendingar um hugsanlega mislitnun. Auk þess getur prófun á litningabreytingum í miðfasa, helst á sömu frumugerð og með aðferðarlýsingu með sambærilegan næmleika, einnig verið gagnleg leið til að ákvarða hvort smákjarnar komi til vegna litningarofs (þegar vitað er að litningatap yrði ekki greint í litningabreytingaprófuninni).

Greining

Öll sýnisgler, þ.m.t. úr jákvæðum samanburðum með leysi og ómeðhöndluðum (ef notaðir), skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu á tíðni smákjarna. Þegar notað er sjálfvirkt talningarkerfi, t.d. frumuflæðissjárgreining, frumumæling með leysigeislaskönnun eða myndgreining, skal nota viðeigandi tækni til að hafa stjórn á bjögun eða reki. Án tillits til þess hvers konar sjálfvirk stöð er notuð til talningar á smákjörnum skal samskeiða meta fjölgunarstuðul fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í, eftirmyndunarstuðul, hlutfallslega tvöföldun hóps og hlutfallslega hækkun frumutölu.

Í ræktum, sem eru meðhöndlaðar með sýtókalasíni-B, skal greina tíðni smákjarna í a.m.k. 2000 tvíkjarna frumum í hverjum styrkleika og samanburði (83. heimild) og frumurnar skulu skiptast jafnt á milli samhliða ræktа, ef þær eru notaðar. Ef notaðar eru stakar ræktir fyrir hvern skammt (sjá 28. lið) skal telja a.m.k. 2000 tvíkjarna frumur í hverri af þeim stöku ræktum (83. heimild). Ef tiltækar, tvíkjarna frumur til talningar í hverjum styrk í hverri ræktun eru miklu færri en 1000 (í tvíteknum ræktum), eða færri en 2000 (í stakri rækt), og ef ekki greinist umtalsverð aukning á smákjörnum skal prófunin endurtekin og notaðar fleiri frumur eða styrkleikar sem hafa minni frumueiturhrif, hvort sem betur á við. Þess skal gætt að telja ekki tvíkjarna frumur sem hafa óreglulega lögun eða ef mikill stærðarmunur er á kjörnunum tveimur í þeim. Auk þess skal tvíkjarna frumum ekki ruglað saman við illa dreifðar fjölkjarna frumur. Frumur, sem innihalda fleiri en tvo kjarna, skal ekki greina með tilliti til smákjarna þar eð grunntíðni smákjarna getur verið hærri í þeim frumum (84. heimild). Talning í einkjarna frumum er ásættanleg ef sýnt er fram á að prófunaríðefnið trufli virkni sýtókalasíns-B. Í slíkum tilvikum getur endurtekin prófun án sýtókalasíns-B verið gagnleg. Talning einkjarna frumna til viðbótar við tvíkjarna frumur getur veitt gagnlegar upplýsingar (85. og 86. heimild) en er ekki skyldubundin.

Í frumulínum, sem eru meðhöndlaðar án sýtókalasíns-B, skal telja smákjarna í a.m.k. 2000 frumum í hverjum styrkleika og samanburði (83. heimild), og frumurnar skulu skiptast jafnt á milli samhliða ræktа, ef þær eru notaðar. Ef notaðar eru stakar ræktir fyrir hvern styrkleika (sjá 28. lið) skal telja a.m.k. 2000 frumur í hverri af þeim stöku ræktum. Ef tiltækar frumur til talningar í hverjum styrk í hverri ræktun eru miklu færri en 1000 (í tvíteknum ræktum), eða færri en 2000 (í stakri rækt), og ef ekki greinist umtalsverð aukning á smákjörnum skal prófunin endurtekin og notaðar fleiri frumur eða styrkleikar sem hafa minni frumueiturhrif, hvort sem betur á við.

Ef notað er sýtókalasín-B skal ákvarða fjölgunarstuðul fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í eða eftirmyndunarstuðul til að meta frumufjölgun (sjá 2. viðbæti) með a.m.k. 500 frumur í hverri rækt. Við meðhöndlun án þess að bæta sýtókalasíni-B við er nauðsynlegt að færa sönnur á að frumurnar í rækt hafi fjölgað sér, eins og rætt er í 24.-28. lið.

Hæfni rannsóknarstofunnar

Rannsóknarstofan skal framkvæma röð tilrauna með jákvæðum viðmiðunaríðefnum í mismunandi gangvirkjum (að lágmarki eitt með og eitt án efnaskiptavirkjunar og eitt í gangvirki sem veldur mislitnun, og valin úr íðefnunum sem eru skráð í töflu 1) og mismunandi neikvæðum samanburðum (þ.m.t. ómeðhöndlaðar ræktir og mismunandi leysar/burðarefni) til að staðfesta að nægileg reynsla sé af greiningunni áður en hún er notuð í venjubundnar prófanir. Svaranirnar í þessum jákvæðu og neikvæðu samanburðum skulu vera í samræmi við heimildir. Þetta á ekki við um rannsóknarstofur sem þegar hafa reynslu, þ.e. hafa tiltækan grunn með rannsóknarsögulegum gögnum eins og skilgreint er í 49.–52. lið.

Kanna skal nokkur valin, jákvæð samanburðaríðefni (sjá töflu 1) í stuttum og löngum meðhöndlunum án efnaskiptavirkjunar, og einnig í stuttri meðhöndlun með efnaskiptavirkjun, til að sýna fram á hæfni við greiningu á litningabrenglandi og mislitnunarvaldandi íðefnum, ákvarða skilvirkni efnaskiptavirkjunarkerfisins og sýna fram á hve viðeigandi talningaraðferðirnar eru (sjónræn greining með smásjá, frumuflæðissjárgreining, frumumæling með leysigeislaskönnun eða myndgreining). Velja skal styrksvið völdu íðefnanna þannig að það fáist samanburðarnákvæmar og styrktengdar aukningar sem eru hærri en bakgrunnsgildið til að sýna fram á næmi og styrksvið prófunarkerfisins.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

Rannsóknarstofan skal ákvarða:

— svið og dreifingu jákvæðs samanburðar samkvæmt rannsóknarsögu,

— svið og dreifingu neikvæðs samanburðar (ómeðhöndlað, leysir) samkvæmt rannsóknarsögu.

Þegar gagna er fyrst aflað um rannsóknarsögulega dreifingu neikvæða samanburðarins skulu samskeiða, neikvæðir samanburðir vera í samræmi við birt neikvæð viðmiðunargögn, ef þau liggja fyrir. Þegar fer að bætast við af tilraunagögnum um dreifingu samanburðarins skal samskeiða neikvæði samanburðurinn helst haldast innan 95% stýrimarka (e. *control limits*) þeirrar samanburðadreifingar (87. og 88. heimild). Rannsóknarsögulegur gagnagrunnur rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð ætti í upphafi að byggjast á 10 tilraunum að lágmarki en æskilegra væri að hann samanstæði af a.m.k. 20 tilraunum sem eru gerðar við sambærileg tilraunaskilyrði. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „*C-charts*, *X-bar charts*“ (88. heimild)) til að greina hversu breytileg viðmiðunargögn þeirra um jákvæða og neikvæða samanburði eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi (83. heimild). Frekari ráðleggingar um uppbyggingu rannsóknarsögulegra gagna og notkun þeirra (þ.e. viðmiðanir fyrir hvaða gögn eru höfð með og hver ekki í rannsóknarsögunni og ásættanleikaviðmiðanir fyrir tiltekna tilraun) er að finna í 87. heimild.

Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til samræmis gagnanna við fyrirliggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Allt verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði.

Gögn um neikvæða samanburði skulu samanstanda af tíðni smákjörnóttra frumna úr stakri rækt eða summu samhliða ræktana, eins og lýst er í 28. lið. Samskeiða neikvæðir samanburðir skulu helst haldast innan 95% stýrimarka samanburðadreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gagnagrunni rannsóknarstofunnar um neikvæða samanburði (87. og 88. heimild). Ef gögn um samskeiða neikvæðan samanburð lenda utan 95% stýrimarka fyrir samanburði getur þó verið ásættanlegt að hafa þau með í rannsóknasögulegri samanburðardreifingu að því tilskildu að gögnin séu ekki mjög miklir einfarar og að það séu sannanir fyrir því að stjórnun prófunarkerfisins sé í lagi (sjá 50. lið) og að ekki sé um tæknileg eða mannleg mistök að ræða.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Framsetning niðurstaðna

Ef sú aðferð er notuð að hindra frymisskiptingu skal aðeins nota tíðni tvíkjarna frumna með smákjörnum (óháð fjölda smákjarna í hverri frumu) við mat á framköllun smákjarna. Greiningu á fjölda frumna með einn, tvo eða fleiri smákjarna má leggja fram aðskilið og getur hún veitt gagnlegar upplýsingar en er ekki skyldubundin.

Ákvarða skal samskeiða mælingar á frumueiturhrifum og/eða frumuhamningu í öllum meðhöndluðum, neikvæðum og jákvæðum samanburðarræktum (16. heimild). Reikna skal fjölgunarstuðul fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í og eftirmyndunarstuðul fyrir allar meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir til að mæla töf á frumuhring þegar notuð er sú aðferð að hindra frymisskiptingu. Ef ekki er notað sýtókalasín-B skal nota hlutfallslega tvöföldun hóps eða hlutfallslega hækkun frumutölu (sjá 2. viðbæti).

Skrá skal gögn um hverja rækt fyrir sig. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Samþykki fyrir prófun byggist á eftirfarandi viðmiðunum:

— Samskeiða neikvæði samanburðurinn er talinn ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð, eins og lýst er í 50. lið.

— Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 50. lið) skulu vekja svaranir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum rannsóknarstofunnar um jákvæðan samanburð og valda tölfræðilega marktækri aukningu miðað við samskeiða neikvæða samanburðinn.

— Farið skal að viðmiðunum um frumufjölgun í samanburðinum með leysinum (25.–27. liður).

— Öll tilraunaskilyrðin voru prófuð nema eitt þeirra hafi gefið jákvæðar niðurstöður (36.–40. liður).

— Nægilegur fjöldi frumna og styrkleika er greinanlegur (28. og 44.–46. liður).

— Viðmiðunin fyrir valinu á hæsta styrkleika er í samræmi við það sem lýst er í 24.–31. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun, við einhver af tilraunaskilyrðunum sem eru skoðuð (sjá 36.–39. lið), ef:

— að minnsta kosti einn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn (89. heimild)

— aukningin er skammtatengd í a.m.k. einu tilraunarskilyrðanna í mati með viðeigandi leitniprófun (sjá 28. lið)

— einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 52. lið).

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið litningarof og/eða aukningu eða tap í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má einnig finna í 90.–92. heimild.

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun ef, við öll tilraunskilyrðin sem eru skoðuð (sjá 36.–39. lið),

— enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

— það er engin skammtatengd aukning í mati með viðeigandi leitniprófun,

— allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði (t.d. 95% stýrimörk fyrir samanburð byggð á Poisson; sjá 52. lið).

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið litningarof og/eða aukningu eða tap í þessu prófunarkerfi. Ráðleggingar um hvaða tölfræðiaðferðir eiga best við má einnig finna í 90.–92. heimild.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

Ef svörunin er hvorki greinilega neikvæð né greinilega jákvæð, eins og lýst er hér á undan, og/eða til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu, skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar. Það getur verið gagnlegt að telja viðbótarfrumur (eftir því sem við á) eða gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota breytt tilraunaskilyrði (t.d. styrkleikabil, önnur skilyrði við efnaskiptavirkjun [þ.e. styrk eða uppruna S9]).

Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að þær séu tvíræðar.

Prófunaríðefni, sem framkalla smákjarna í smákjarnaprófuninni í glasi, geta gert það af því þau framkalla litningarof, litningatap eða samsetningu af þessu tvennu. Gera má frekari greiningu með notkun þráðhaldsmótefna, staðbundinna þráðhaftssértækra þreifara eða öðrum aðferðum til að ákvarða hvort gangvirkið sem framkallar smákjarna sé vegna litningabrenglunar- eða mislitnunarvirkni.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni:

— uppruni, lotunúmer, síðasti notkunardagur, ef hann liggur fyrir,

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, ef hann er þekktur.

— hvarfgirni prófunaríðefnanna við leysinn eða burðarefnið eða frumuræktarmiðilinn,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum, ef þekkt,

— mæling á sýrustigi, osmólalstyrk og botnfellingu í ræktunarmiðlinum sem prófunaríðefninu var bætt í, eins og við á.

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Leysir:

— rök fyrir vali á leysi,

— hundraðshluti leysis í lokaræktunarmiðlinum

Frumur:

— gerð og uppruni frumna sem eru notaðar,

— hæfi þeirrar frumugerðar sem er notuð,

— ef um er að ræða frumulínur, upplýsingar um að þær séu ekki smitaðar af berfrymingum,

— upplýsingar um lengd frumuhrings eða fjölgunarstuðul frumulína,

— ef eitilfrumur eru notaðar, kyn blóðgjafa, aldur og allar upplýsingar um gjafann sem skipta máli, heilblóð eða einangraðar eitilfrumur, jafnskiptingarræsirinn sem er notaður,

— eðlileg lengd frumuhrings (neikvæður samanburður),

— umsáningartala frumulína, ef fyrirliggjandi,

— aðferðir til að viðhalda frumuræktum frumulína,

— eðlilegur fjöldi litninga í frumulínum.

Prófunarskilyrði

— auðkenni efnis sem er notað til að hindra umfrymisskiptingu (t.d. sýtókalasín-B), ef það er notað, og styrkur þess og lengd váhrifa þeirra á frumurnar,

— styrkleiki prófunaríðefnisins, gefinn upp sem lokastyrkur í ræktunarmiðlinum (t.d. í μg eða mg/ml eða mM af ræktunarmiðli),

— rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda ræktа sem eru notuð, þ.m.t. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni,

— samsetning ræktunarmiðils, styrkur CO_2, ef við á, rakastig,

— styrkleiki (og/eða rúmmál) leysis og prófunaríðefnis sem er bætt í ræktunarmiðilinn,

— viðstöðuhitastig og -lengd sýnisins,

— lengd meðhöndlunar,

— hvenær frumur eru heimtar eftir meðhöndlun,

— frumuþéttleiki við sáningu ef við á,

— gerð og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfisins (uppruni S9, tilreiðsluaðferð S9-blöndunnar, styrkleiki eða rúmmál S9-blöndunnar og S9 í lokaræktunarmiðlinum, gæðaeftirlit með S9, (t.d. ensímvirkni, dauðhreinsun, efnaskiptageta),

— jákvæð og neikvæð samanburðaríðefni, lokastyrkleiki, skilyrði og lengd meðhöndlunar og afturbatatímabil,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja og tæknin sem er notuð við litun,

— skilyrði við talningu smákjörnóttra frumna (val á greinanlegum frumum og greining smákjarna),

— fjöldi frumna sem eru greindar,

— aðferðir við mælingar á frumueiturhrifum,

— allar viðbótarupplýsingar sem skipta máli varðandi frumueiturhrif og aðferðina sem er notuð,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða tvíræðar,

— aðferð eða aðferðir sem eru notaðar við tölfræðilega greiningu,

— aðferðir, s.s. notkun þráðhaldsmótefna eða þráðhaftssértækra þreifara sem ná yfir allt þráðhaftið, til að ákvarða hvort smákjarnar innihalda heila eða brotna litninga, ef við á,

— aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða sýrustig, osmólalstyrk og útfellingu.

Niðurstöður:

— skilgreining á frumum sem eru ásættanlegar til greiningar,

— ef ekki er notað sýtókalasín B, fjöldi meðhöndlaðra frumna og fjöldi heimtra frumna fyrir hverja rækt þegar frumulínur eru notaðar,

— mælingar á frumueiturhrifum sem eru notaðar, t.d. fjölgunarstuðull fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í eða eftirmyndunarstuðull ef um er að ræða aðferð þar sem notuð er hindrun á umfrymisskiptingu, hlutfallsleg hækkun frumutölu eða hlutfallsleg tvöföldun hóps ef ekki er notuð hindrun á umfrymisskiptingu eða aðrar mælingar, ef þær eru gerðar, (t.d. samrennsli frumna, stýrður frumudauði, drep, miðfasatalning, tíðni tvíkjarna frumna),

— merki um útfellingu og hvenær hún er ákvörðuð,

— gögn um sýrustig og osmólalstyrk í meðhöndlunarmiðlinum ef þessir þættir eru mældir,

— dreifing ein-, tví- og fjölkjarna frumna ef notuð er sú aðferð að hindra umfrymisskiptingu,

— fjöldi frumna sem smákjarnar finnast í, tilgreindur aðskilið fyrir hverja meðhöndlaða rækt og samanburðarrækt og skilgreint hvort það eru ein- eða tvíkjarnafrumur, eftir því sem við á,

— tengsl milli styrks og svörunar, ef unnt er,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð (styrkleikar og leysar),

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir) og jákvæðan samanburð, ásamt sviðum, meðaltölum og staðalfráviki og 95% stýrimörkum dreifingar, sem og fjöldi gagna,

— tölfræðilegar greiningar, p-gildi ef þau liggja fyrir.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Ályktanir.

HEIMILDIR:

1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.

8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.

9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.

10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.

11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.

12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.

13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.

14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.

15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.

16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, 211-219.

17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.

18) Chapter B.10 of this Annex: *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*,.

19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.

20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.

21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.

22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.

23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.

24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.

27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.

28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.

29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.

30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.

32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.

33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.

34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.

35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, aðgengilegt á: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Aðgengilegt á:http://ecvam.jrc.it/index.htm.

39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol 23/4, pp. 271-283.

40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.

41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.

42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*., Vol. 49, pp. 439-452.

46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.

48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.

53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. **37/1**, pp. 31-45.

56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.

59) Matsushima, T. *et al*. (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.

61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Aðgengilegur á: http://www.pops.int/

62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.

67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research*, 564, 97-100.

69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.

71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Aðgengilegt samkvæmt beiðni.

74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.

78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.

79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.

80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.

81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.

82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.

87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "*In vitro* micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.'

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR:

Efni sem veldur mislitnun: öll íðefni eða ferli sem hafa í för með sér mislitnun í frumum eða lífverum með því að víxlverka á þætti á jafnskiptingar- og rýriskiptingarstigi frumuskiptingar.

Mislitnun: öll frávik frá eðlilegum fjölda tvílitna (eða einlitna) litninga sem nema einum eða fleiri litningum en ekki ef um er að ræða heilt sett eða heil sett litninga (fjöllitnun).

Stýrður frumudauði: frumudauði sem er stýrt og einkennist af röð þrepa sem leiða til sundrunar frumna í agnir sem bindast himnunni og er síðan eytt með agnaáti eða með losun.

Frumufjölgun: aukning á frumufjölda vegna jafnskiptingar frumna.

Þráðhaft: DNA-hluti litnings þar sem báðir litningsþræðir eru fastir saman og þar sem bæði þráðhöldin eru fest hlið við hlið.

Íðefni: efni eða blanda.

Styrkleiki: vísar til lokastyrkleika prófunaríðefnisins í ræktunarmiðlinum.

Efni sem veldur litningabrenglun: öll íðefni eða allir atburðir sem valda byggingarlegum litningabreytingum í frumuhópum eða heilkjarnalífverum.

Umfrymisskipting: frumuskipting sem verður strax að lokinni jafnskiptingu til að mynda tvær dótturfrumur, hvora um sig með einn kjarna.

Fjölgunarstuðull fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í (CBPI): hlutfallið milli frumna í meðhöndlaða hópnum, sem hafa skipt sér tvisvar, og í samanburðinum sem fékk ekki meðhöndlun (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Frumuhamning: hömlun á frumuvexti (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Frumueiturhrif: Að því er varðar rannsóknir með notkun sýtókalasíns B sem þessi prófunaraðferð nær yfir eru frumueiturhrif greind sem lækkun fjölgunarstuðuls fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í eða eftirmyndunarstuðuls í meðhöndluðu frumunum borið saman við neikvæða samanburðinn (sjá 26. lið og 2. viðbæti).

Að því er varðar rannsóknir án notkunar sýtókalasíns B sem þessi prófunaraðferð nær yfir eru frumueiturhrif greind sem minnkun á hlutfallslegri tvöföldun hóps (RPD) eða hlutfallsleg hækkun frumutölu (RICC) hjá meðhöndluðu frumunum borið saman við neikvæða samanburðinn (sjá 27. lið og 2. viðbæti).

Erfðaeiturhrif: almennt hugtak sem nær yfir allar gerðir skaða á DNA eða litningum, þ.m.t. rof, úrfelling, viðbætur, breytingar á núkleótíðum og tengingar þeirra, endurröðun, genastökkbreytingar, litningabreytingar og mislitnun. Erfðaeiturhrif hafa ekki öll í för með sér stökkbreytingar eða stöðugar litningaskemmdir.

Frumur í millifasa: frumur sem eru ekki á jafnskiptingarstigi.

Þráðhald: prótínrík efnisskipan sem safnast saman við þráðhaft á litningi þar sem spóluþræðir festast meðan á frumuskiptingu stendur og það gerir dótturlitningunum kleift að færast skipulega að skautum dótturfrumnanna.

Smákjarnar: smágerðir kjarnar, sem eru aðskildir frá og til viðbótar við meginkjarna frumnanna, sem verða til í lokafasa jafnskiptingar eða rýriskiptingar út frá eftirliggjandi litningabrotum eða heilum litningum.

Jafnskipting: skipting frumukjarnans sem skiptist oftast í forfasa, formiðfasa, miðfasa, síðfasa og lokafasa.

Jafnskiptingarhlutfall: hlutfallið milli fjölda frumna í miðfasa og mælds heildarfjölda frumna í frumuhópi, vísbending um hve ör fjölgunin er í þessum frumuhópi.

Stökkbreyting: veldur arfgengri breytingu á röð eða röðum DNA-basapara í litningum eða breytingu á byggingu litninga (litningabreytingum).

Aðskilnaður verður ekki: paraðir litningsþræðir losna ekki í sundur og aðskiljast ekki rétt til dótturfrumnanna sem eru að verða til og það hefur í för með sér að dótturfrumurnar hafa afbrigðilegan fjölda litninga.

p53 ástand: prótín p53 hefur hlutverk í stillingu frumuhrings, stýrðum frumudauða og DNA-viðgerð. Frumum, sem skortir virkt p53 prótín og geta ekki stöðvað frumuhring eða losað skemmdar frumur með stýrðum frumudauða eða öðru gangvirki (t.d. vakningu DNA-viðgerðar) sem tengist virkni p53 sem viðbragð við DNA-skemmd, ætti fræðilega séð að vera hættara við genastökkbreytingum eða litningabreytingum.

Fjöllitnun: breytingar á litningafjölda í heilu setti eða settum litninga í frumum eða lífverum í stað staks litnings eða stakra litninga (mislitnun).

Fjölgunarstuðull (PI): aðferð til að mæla frumueiturhrif ef sýtókalasín-B er ekki notað (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Hlutfallsleg hækkun frumutölu (RICC): aðferð til að mæla frumueiturhrif ef sýtókalasín-B er ekki notað (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Hlutfallsleg tvöföldun hóps (RPD): aðferð til að mæla frumueiturhrif ef sýtókalasín-B er ekki notað (sjá formúlu í 2. viðbæti).

Eftirmyndunarstuðull (RI): hlutfallið milli fjölda frumuskiptingarhringja, sem hefur verið lokið að fullu í meðhöndlaðri rækt, og fjölda þeirra í ómeðhöndlaðri samanburðarrækt, meðan á váhrifatímabilinu og afturbata stendur (sjá formúlu í 2. viðbæti).

S9-lifrarþáttur: flot af lifrarjafningi eftir skiljun við 9000 g, þ.e. útdráttur úr hrárri lifur.

S9-blanda: blanda af S9-lifrarþættinum og hjálparþáttunum sem eru nauðsynlegir fyrir virkni efnaskiptaensíma.

Samanburður með leysi: almennt hugtak til útskýringar á samanburðarræktum sem í er eingöngu settur leysirinn sem er notaður til að leysa upp prófunaríðefnið.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Ómeðhöndlaður samanburður: ræktir sem eru ekkert meðhöndlaðar (þ.e. hvorki með prófunaríðefni né leysi) en eru unnar samtímis og á sama hátt og ræktirnar sem prófunaríðefnið er sett í.

———

2. viðbætir

FORMÚLUR FYRIR MAT Á FRUMUEITURHRIFUM

Ef sýtókalasín-B er notað skal mat á frumueiturhrifum byggjast á **fjölgunarstuðli fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í (CBPI**) eða **eftirmyndunarstuðli (RI)** (17. og 69. heimild). Fjölgunarstuðull fyrir frumur sem skipting umfrymis er hindruð í gefur til kynna meðalfjölda kjarna hverrar frumu og hægt er að nota hann til að reikna út frumufjölgun. Eftirmyndunarstuðull gefur til kynna hlutfallslegan fjölda frumuhringja hverrar frumu meðan hún verður fyrir váhrifum frá sýtókalasíni-B í meðhöndluðum ræktum í samanburði við samanburðarræktir og hægt er að nota hann til að reikna út hundraðshlutfall frumuhamningar.

$$\% \text{ frumuhamningar} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

og:

T = rækt meðhöndluð með prófunaríðefni

C = samanburðarrækt

þar sem:

$$CBPI = \frac{\big((\text{Fjöldi einkjarna frumna}) + (2 \times \text{Fjöldi tvíkjarna frumna}) + (3 \times \text{Fjöldi fjölkjarna frumna})\big)}{(\text{Heildarfjöldi frumna})}$$

CBPI-gildið 1 (allar frumur eru einkjarna) jafngildir 100% frumuhamningu.

Frumuhamning = 100-RI

$$RI = \frac{\big((\text{Fjöldi tvíkjarna frumna}) + (2 \times \text{Fjöldi fjölkjarna frumna})\big)/(\text{Heildarfjöldi frumna})_T}{\big((\text{Fjöldi tvíkjarna frumna}) + (2 \times \text{Fjöldi fjölkjarna frumna})\big)/(\text{Heildarfjöldi frumna})_C} \times 100$$

T= meðhöndlaðar ræktir

C= samanburðarræktir

53% eftirmyndunarstuðull merkir því að samanborið við fjölda frumna, sem hafa skipt sér og myndað tvíkjarna og fjölkjarna frumur í samanburðarræktinni, hafa aðeins 53% af þeim fjölda skipt sér í meðhöndluðu ræktinni, þ.e. 47% frumuhamning.

Ef sýtókalasín-B er ekki notað er mælt með því að mat á frumueiturhrifum sé byggt á **hlutfallslegri hækkun frumutölu (RICC)** eða á **hlutfallslegri tvöföldun hóps (RPD)** (69. heimild) þar eð báðar aðferðirnar taka tillit til þess hlutfalls frumuhópsins sem hefur skipt sér.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{\big(\text{Aukinn fjöldi frumna í meðhöndluðum ræktum(við lok– við upphaf)}\big)}{\big(\text{Aukinn fjöldi frumna í samanburðarrækum(við lok– við upphaf)}\big)} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Fjöldi hópa sem tvöfaldast í meðhöndluðum ræktum})}{(\text{Fjöldi hópa sem tvöfaldast í samanburðarræktum})} \times 100$$

þar sem:

Tvöföldun hópa = [log (frumufjöldi eftir meðhöndlun ÷ upphaflegur frumufjöldi)] ÷ log 2

Því bendir 53% RICC- eða RPD-gildi til 47% frumueiturhrifa/frumuhamningar.

Hægt er að nota **fjölgunarstuðul (PI)** við mat á frumueiturhrifum með því að telja klóna sem samanstanda af einni frumu (cl1), tveimur frumum (cl2), þremur til fjórum frumum (cl4) og 5–8 frumum (cl8).

$$PI = \frac{\big((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8)\big)}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

Fjölgunarstuðullinn hefur einnig verið notaður sem gagnlegur og áreiðanlegur mæliþáttur fyrir frumueiturhrif í frumulínum sem eru ræktaðar í glasi án viðbætts sýtókalasíns-B (35.–38. heimild) og má líta svo á að hann sé gagnlegur viðbótarmæliþáttur.

Í öllu falli ætti frumufjöldi að vera sá sami áður en meðhöndlun hefst og einnig í meðhöndluðum og neikvæðum samanburðarræktum.

Ekki er lengur mælt með að nota fjölda frumna í meðhöndluðum ræktum/fjölda frumna í samanburðarræktum (RCC) sem mæliþátt fyrir frumueiturhrif, þótt það hafi áður verið gert, af því hann getur vanmetið frumueiturhrif.

Þegar sjálfvirk talningarkerfi eru notuð, t.d. frumuflæðissjárgreining, frumumæling með leysigeislaskönnun eða myndgreining, getur fjöldi kjarna komið í stað fjölda frumna í formúlunni.

Tvöföldun hóps eða eftirmyndunarstuðull í neikvæðum samanburðarræktum skal vera í samræmi við kröfuna um að taka frumusýni eftir meðhöndlun þegar liðinn er sá tími sem jafngildir einni og hálfri til tveimur lengdum eðlilegs frumuhrings.

15) Í B-hluta bætast eftirfarandi kaflar við:

„B.59 ***Húðnæming í efni:*** **Bein prófun á hvarfgirni við peptíð (DPRA)**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 442C um prófanir (2015). Með húðnæmi er átt við efni sem leiðir til ofnæmissvörunar í kjölfar snertingar við húð, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) (1. heimild) og reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna (reglugerð (EB) nr. 1272/2008) ([1]). Þessi prófunaraðferð felur í sér prófun í efni (e. *in chemico*) (bein prófun á hvarfgirni við peptíð — DPRA) sem á að nota til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

Almennt samkomulag er um helstu líffræðilegu atburði sem liggja að baki húðnæmingu. Fyrirliggjandi þekking á efnafræðilegu og líffræðilegu gangvirki sem tengist húðnæmingu hefur verið tekin saman í formi ferlis neikvæðra afleiðinga (2. heimild) frá sameindaræsingunni, um milliatburðina, að neikvæðu áhrifunum, þ.e.a.s. húðbólgu vegna snertiofnæmis hjá mönnum eða snertiofurnæmi hjá nagdýrum. Innan ferlis neikvæðra afleiðinga við húðnæmingu er sameindaræsingin samgild tenging rafsækinna efna við sameindasækna miðju húðprótína.

Mat á húðnæmingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra. Sígildu aðferðirnar „Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GMPT)“ (hámörkunarprófun á naggrísum) og „Buehler-prófun“ (prófunaraðferð B.6 (3. heimild)), sem byggjast á naggrísum, eru notaðar til að rannsaka bæði örvunar- og framköllunarstig húðnæmingar. Músaprófun, eitlagreining (LLNA, prófunaraðferð B.42 (4. heimild)) og ógeislavirku, breyttu aðferðirnar tvær, LLNA: DA (prófunaraðferð B.50 (5. heimild)) og LLNA: BrdU-ELISA (prófunaraðferð B.51 (6. heimild)), sem allar meta eingöngu viðbrögð við örvun, hafa einnig hlotið viðurkenningu því þær eru fremri prófunum á naggrísum með tilliti til velferðar dýra og eru hlutlæg mæling á örvunarstigi húðnæmingar.

Nýlega hafa prófunaraðferðir sem byggja á gangvirkjum í prófunum í efni og í glasi talist vísindalega gildar til að meta húðnæmingarhættu íðefna. Þó verður þörf á samsettum aðferðum án tilrauna á dýrum (í tölvulíkani, í efni, í glasi) innan samþættra aðferða við prófun og mat (IATA) til að unnt sé að skipta að öllu leyti út þeim prófunum á dýrum sem eru sem stendur í notkun, í ljósi takmarkana allra prófunaraðferða án dýra, sem eru tiltækar, á umfjöllunarsviði um ferli neikvæðra afleiðinga (2. og 7. heimild).

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

Beinni prófun á hvarfgirni við peptíð er ætlað að fjalla um sameindaræsinguna innan ferlis neikvæðra afleiðinga við húðnæmingu, þ.e.a.s. hvarfgirni við prótín, með því að magngreina hvörfun prófunaríðefnis við tilbúin peptíðlíkön sem innihalda annað hvort lýsín eða systeín (8. heimild). Hundraðshlutfall eyðingargilda systeín- og lýsínpeptíða er síðan notað til að flokka efni í einn af fjórum flokkum hvarfgirni til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi (9. heimild).

Bein prófun á hvarfgirni við peptíð var metin í fullgildingarrannsókn undir forystu tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) og þar á eftir í óháðri jafningjaryni hjá vísindalegri ráðgjafarnefnd tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum og taldist vísindalega traust (10. heimild) til notkunar sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings til að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi til hættuflokkunar og merkingar. Dæmi um notkun á gögnum úr beinni prófun á hvarfgirni við peptíð í samsetningu með öðrum upplýsingum eru tilgreind í heimildum (11.–14. heimild).

Skilgreiningar eru gefnar í I. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, NOTHÆFI OG TAKMARKANIR

Fylgni hvarfgirni við prótín og húðnæmingarmáttar er vel þekkt (15.–17. heimild). Þar eð prótínbinding er einungis einn lykilatburður, enda þótt hann sé sameindaræsingin innan ferlis neikvæðra afleiðinga við húðnæmingu, eru þó upplýsingar um hvarfgirni við prótín, sem verða til með aðferðum með og án prófana, e.t.v. ekki nægilegar einar og sér til að komast að niðurstöðu um að húðnæmingarmáttur íðefna sé ekki fyrir hendi. Þess vegna ætti að taka gögn, sem verða til með þessari prófunaraðferð, til athugunar í tengslum við samþættar aðferðir, s.s. samþætta aðferð við prófun og mat, sameina þær öðrum viðbótarupplýsingum sem t.d. fást með greiningum í glasi þar sem fengist er við aðra lykilatburði innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu sem og úr aðferðum án prófana, þ.m.t. ályktunum út frá byggingarlega hliðstæðum efnum um efnafræðilega hliðstæð efni.

Hægt er að nota þessa prófunaraðferð í samsetningu með öðrum viðbótarupplýsingum til stuðnings við að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki húðnæmandi með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat. Þessa prófunaraðferð er ekki hægt að nota eina og sér, hvorki til að undirflokka húðnæma í undirundirflokk 1A og 1B, eins og skilgreint er í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, né til að spá fyrir um mátt vegna ákvarðana um öryggismat. Þó er hægt að nota jákvæða niðurstöðu úr beinni prófun á hvarfgirni við peptíð eina og sér til að flokka íðefni í 1. undirflokk HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, háð regluramanum.

Aðferðin bein prófun á hvarfgirni við peptíð reyndist yfirfæranleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af greiningum með háþrýstivökvaskiljun. Búast má við að samanburðarnákvæmni spáa sem fást með prófunaraðferðinni sé við 85% markið innan rannsóknarstofa og 80% milli rannsóknarstofa (10. heimild). Niðurstöður sem verða til í fullgildingarrannsókninni (18. heimild) og birtar rannsóknir (19. heimild) benda í heildina til þess að nákvæmni beinnar prófunar á hvarfgirni við peptíð til að skilja á milli næma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem ekki eru næmandi sé 80% (N=157) með 80% næmi (88/109) og 77% sértæki (37/48) þegar hún er borin saman við niðurstöður úr eitlagreiningu. Líklegra er að bein prófun á hvarfgirni við peptíð vanmeti íðefni sem sýna vægan húðnæmingarmátt eða húðnæmingarmátt í meðallagi (þ.e. undirundirflokkur 1B í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) en íðefni sem sýna mikinn húðnæmingarmátt (þ.e. undirundirflokkur 1A í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (18. og 19. heimild). Þó eru gildin fyrir nákvæmni, sem hér eru gefin fyrir beinu prófunina á hvarfgirni við peptíð sem sjálfstæða prófunaraðferð, einungis leiðbeinandi þar eð líta ætti á prófunaraðferðina í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. liðar hér að framan. Þegar aðferðir, án tilrauna á dýrum, vegna húðnæmingar eru metnar ætti enn fremur að hafa í huga að eitlagreining, sem og aðrar prófanir á dýrum, endurspegla e.t.v. ekki að fullu aðstæður hjá tegundinni sem miðað er við, þ.e. menn. Á grundvelli fyrirliggjandi heildargagna reyndist bein prófun á hvarfgirni við peptíð nothæf fyrir prófunaríðefni sem falla undir mismunandi hópa virkra lífrænna efna, gangvirki hvarfa, húðnæmingarmátt (eins og ákvarðað er í rannsóknum í lífi) og eðlisefnafræðilega eiginleika (8.–10. heimild og 19. heimild). Þegar þessar upplýsingar eru teknar saman benda þær til þess að bein prófun á hvarfgirni við peptíð sé gagnleg til að stuðla að því að greina áhættu á húðnæmingu.

Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa og tengist ekki nothæfi beinnar prófunar á hvarfgirni við peptíð til prófunar á efnum og/eða blöndum. Þessi prófunaraðferð er ekki nothæf til prófana á málmsamböndum því vitað er að þau hvarfast við prótín með öðrum gangvirkjum en samgildum tengslum. Prófunaríðefni skal vera uppleysanlegt í viðeigandi leysi við lokastyrk sem nemur 100 mM (sjá 18. lið). Þó er hægt að prófa prófunaríðefni, sem eru ekki leysanleg í þessum styrk, við lægri leysnistyrk. Í slíku tilviki er enn hægt að nota jákvæða niðurstöðu til að styðja greiningu prófunaríðefnisins sem húðnæmis en ekki skal draga ákveðna ályktun um skort á hvarfgirni út frá neikvæðri niðurstöðu. Sem stendur eru takmarkaðar upplýsingar fyrirliggjandi um nothæfi beinnar prófunar á hvarfgirni við peptíð vegna blandna með þekkta samsetningu (18. og 19. heimild). Tæknilega séð telst bein prófun á hvarfgirni við peptíð samt sem áður nothæf til prófunar á fjölþáttaefnum og blöndum með þekkta samsetningu (sjá 18. lið). Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. Ekki er hægt að nota núverandi spálíkan fyrir flóknar blöndur með óþekkta samsetningu eða fyrir efni með óþekkta eða breytilega samsetningu, flókin myndefni efnahvarfa eða líffræðileg efni (þ.e. UVCB-efni) vegna skilgreinds mólhlutfalls prófunaríðefnis og peptíðs. Í þeim tilgangi þarf að þróa nýtt spálíkan sem byggir á fellingarmælingaraðferð. Í tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á að prófunaraðferðin sé ekki nothæf fyrir aðra tiltekna flokka íðefna skal ekki nota prófunaraðferðina fyrir þessa tilteknu flokka íðefna.

Þessi prófunaraðferð er aðferð í efni sem nær ekki yfir efnaskiptakerfi. Ekki er hægt að prófa íðefni, sem útheimta ensímlífvirkjun (e. *enzymatic bioactivation*) til að hafa húðnæmingarmátt (þ.e. lífrænt umbreyttir meðvakar (e. *pro-haptens)*), með þessari prófunaraðferð. Greint hefur verið frá því að íðefni, sem verða næmar eftir umbreytingu án tilstillis lífvera (þ.e. ólífrænt umbreyttir meðvakar (e. *pre-haptens*)), greinist í sumum tilvikum rétt með prófunaraðferðinni (18. heimild). Í ljósi framangreinds ætti að túlka neikvæðar niðurstöður, sem fást með prófunaraðferðinni, með skírskotun til umræddra takmarkana og í tengslum við aðrar upplýsingaveitur innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat. Prófunaríðefni sem tengjast ekki peptíðinu með samgildum tengjum heldur stuðla að oxun þess (þ.e. systeíntvíliðun) gætu leitt til hugsanlegrar ofáætlunar á peptíðeyðingu og leitt til hugsanlegra falsjákvæðra spáa og/eða flokkunar í hærri flokk hvarfgirni (sjá 29. og 30. lið).

Eins og er lýst er bein prófun á hvarfgirni við peptíð til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi. Þó getur hún einnig hugsanlega stuðlað að mati á næmingarmætti (11. heimild) þegar hún er notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat. Þó er þörf á frekari vinnu, helst á grundvelli gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr beinni prófun á hvarfgirni við peptíð geta hugsanlega legið til grundvallar mati á næmingarmætti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Bein prófun á hvarfgirni við peptíð er aðferð í efni sem magngreinir þann styrk peptíða, sem innihalda systeín eða lýsín, sem eftir er eftir að þau hafa verið látin standa með prófunaríðefninu í 24 klst. við 25 ± 2,5 °C. Tilbúnu peptíðin innihalda fenýlalanín til að auðvelda greiningu. Hlutfallslegur peptíðstyrkur er mældur með háþrýstivökvaskiljun með skolun með stigulbreytingu og greiningu þar sem notast er við útfjólublátt ljós við 220 nm. Hundraðshlutfall eyðingargilda systeín- og lýsínpeptíða er síðan reiknað út og notað í spálíkan (sjá 29. lið) sem gerir það kleift að flokka prófunaríðefnið í einn af fjórum flokkum hvarfgirni sem eru notaðir til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi.

Áður en aðferðin, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10 sem eru tilgreind í 2. viðbæti.

VERKFERLI

Þessi prófunaraðferð er byggð á aðferðarlýsingu DPRA DB-ALM nr. 154 (20. heimild) sem er aðferðarlýsingin sem var notuð í samræmdri fullgildingarrannsókn tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins og Evrópumiðstöðvar um fullgildingu staðgönguaðferða (EURL ECVAM). Mælt er með því að þessi aðferðarlýsing sé notuð þegar þessi aðferð er innleidd og notuð í rannsóknarstofu. Hér á eftir er lýsing á helstu þáttum og tilhögun beinnar prófunar á hvarfgirni við peptíð. Ef annars konar uppsetning háþrýstivökvaskiljunar er notuð skal sýna fram á jafngildi hennar við fullgiltu uppsetninguna sem lýst er í aðferðarlýsingu DB-ALM (t.d. með því að prófa hæfnisefnin í 2. viðbæti).

Tilreiðsla á peptíðum sem innihalda systeín eða lýsín

Stofnlausnir af systeíni (Ac-RFAA**C**AA-COOH) og lýsíni (Ac-RFAA**K**AA-COOH), sem innihalda tilbúin peptíð af hreinleika sem er yfir 85% og helst á bilinu 90–95%, skulu tilreiddar rétt fyrir viðstöðu þeirra með prófunaríðefninu við tiltekin skilyrði. Endanlegur styrkur systeínpeptíðsins ætti að vera 0,667 mM í fosfatjafnalausn með pH-gildið 7,5 en endanlegur styrkur lýsínpeptíðsins ætti að vera 0,667 mM í ammóníumasetatjafnalausn við pH-gildið 10,2. Keyrsluröð háþrýstivökvaskiljunarinnar skal sett upp þannig að greiningartíma hennar sé haldið undir 30 klst. Í þeirri uppsetningu háþrýstivökvaskiljunarinnar, sem er notuð í fullgildingarrannsókninni og lýst í þessari prófunaraðferð, er hægt að hafa allt að 26 greiningarsýni (þar með eru prófunaríðefnið, jákvæður samanburður og viðeigandi fjöldi samanburða með leysi, sem fer eftir fjölda einstakra leysa sem eru notaðir í prófuninni; hvert og eitt í þrefaldri prófun) í einni háþrýstivökvaskiljunarröð. Nota skal sömu systeín- og lýsínpeptíðstofnlausnir í allar samhliða prófanir sem eru greindar í sömu keyrslu. Mælt er með því að sannreyna að leysni einstakra peptíðlota sé eins og hún á að vera áður en þær eru notaðar.

Tilreiðsla prófunaríðefnis

Áður en greining er gerð skal meta leysni prófunaríðefnis í viðeigandi leysi, í kjölfar uppleysingarferlisins sem lýst er í aðferðarlýsingunni DPRA DB-ALM (20. heimild). Viðeigandi leysir mun leysa prófunaríðefnið alveg upp. Þar eð prófunaríðefnið er látið standa við tiltekin skilyrði í miklu umframmagni, annað hvort með systeín- eða lýsínpeptíðunum, í beinu prófuninni á hvarfgirni við peptíð telst sjónræn skoðun á því að tær lausn myndist fullnægjandi til að ganga úr skugga um að prófunaríðefnið (og allir efnisþættir þess, ef um er að ræða prófun á fjölþáttaefni eða -blöndu), sé uppleyst. Hentugir leysar eru asetónítríl, vatn, 1:1-blanda af vatni og asetónítríli, ísóprópanól og aseton eða 1:1-blanda af asetóni og asetónítríli. Hægt er að nota aðra leysa svo fremi þeir hafi ekki áhrif á stöðugleika peptíðsins en hann er vaktaður með viðmiðunarsamanburðum C (þ.e. sýni sem eru peptíðið eitt og sér uppleyst í viðeigandi leysi; sjá 3. viðbæti). Ef prófunaríðefnið er ekki uppleysanlegt í neinum þessara leysa er síðasti kosturinn að leysa það upp í 300 µL af dímetýlsúlfoxíði og þynna lausnina sem til verður með 2700 µL af asetónítríli og ef prófunaríðefnið er ekki leysanlegt í þessari blöndu skal gera tilraun til að leysa sama magn prófunaríðefnis upp í 1500 µL af dímetýlsúlfoxíði og þynna lausnina sem til verður með 1500 µL af asetónítríli. Prófunaríðefnið skal forvigtað í glermælingaglös og leyst upp í viðeigandi leysi, rétt áður en það er prófað, svo að til verði 100 mM lausn. Að því er varðar blöndur og fjölþáttaefni af þekktri samsetningu skal ákvarða einn hreinleika með summu hlutfalls efnisþátta þeirra (að undanskildu vatni) og ákvarða skal eina sýndarsameindaþyngd með hliðsjón af sameindaþyngd hvers efnisþáttar í blöndunni fyrir sig (að undanskildu vatni) og hlutfalli hvers þeirra um sig. Hreinleikann og sýndarsameindaþyngdina sem af þessu leiða skal síðan nota til að reikna út þyngd prófunaríðefnis sem þarf til að tilreiða 100 mM lausn. Að því er varðar fjölliður, sem ekki er hægt að ákvarða ríkjandi sameindaþyngd fyrir, er hægt að nota sameindaþyngd einliðu (eða sýndarsameindaþyngd mismunandi einliða sem mynda fjölliðuna) til að tilreiða 100 mM lausn. Við prófanir á blöndum, fjölþáttaefnum eða fjölliðum af þekktri samsetningu skal þó einnig kanna hvort einnig sé hægt að prófa íðefnið óblandað. Að því er varðar vökva skal prófa óblandaða íðefnið eins og það kemur fyrir án forþynningar með viðstöðu við mólhlutfallið 1:10 annars vegar og 1:50 hins vegar með systeín- og lýsínpeptíðunum. Að því er varðar föst efni skal leysa prófunaríðefnið upp í hámarksleysnistyrk í sama leysi og er notaður til að tilreiða 100 mM sýndarlausnina. Síðan skal prófa það eins og það kemur fyrir án frekari þynningar með viðstöðu við hlutfallið 1:10 annars vegar og 1:50 hins vegar með systeín- og lýsínpeptíðunum. Samsvarandi niðurstöður (hvarfgirni eða engin hvarfgirni) úr 100 mM sýndarlausninni og óblandaða íðefninu ættu að gefa færi á ákveðinni ályktun um niðurstöðuna.

Tilreiðsla á jákvæða samanburðinum, viðmiðunarsamanburðinum og samanburðinum vegna samtímis skolunar (e. *coelution control*)

Nota skal sinnamínaldehýð (CAS 104-55-2; ≥ 95% matvælagæðahreinleiki) sem jákvæðan samanburð við styrk sem nemur 100 mM í asetónítríli. Hægt er að nota aðra heppilega jákvæða samanburði, sem helst gefa eyðingargildi um miðbik bilsins, ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur. Auk þess ættu viðmiðunarsamanburðir (þ.e. sýni sem innihalda einungis peptíðið, uppleyst í viðeigandi leysi) einnig að vera með í keyrsluröð háþrýstivökvaskiljunar og þeir eru notaðir til að sannprófa hentugleika háþrýstivökvaskiljunarkerfisins áður en greining fer fram (viðmiðunarsamanburðir A), stöðugleika viðmiðunarsamanburða yfir lengri tíma (viðmiðunarsamanburðir B) og til að sannprófa að leysirinn sem er notaður til að leysa prófunaríðefnið upp hafi ekki áhrif á hundraðshlutfall peptíðeyðingarinnar (viðmiðunarsamanburðir C) (sjá 3. viðbæti). Viðeigandi viðmiðunarsamanburðir fyrir hvert íðefni eru notaðir til að reikna út hundraðshlutfall peptíðeyðingar fyrir viðkomandi íðefni (sjá 26. lið). Auk þess skal hafa samanburð vegna skolunar á sama tíma, með prófunaríðefninu eingöngu, fyrir sérhvert prófunaríðefni sem er greint með í keyrsluröðinni til að greina hugsanlega skolun prófunaríðefnisins á sama tíma og annað hvort lýsín- eða systeínpeptíðið.

Prófunaríðefni látið standa við tiltekin skilyrði með systeín- og lýsínpeptíðlausnum

Systeín- og lýsínpeptíðlausnir skulu látnar standa með prófunaríðefninu í glermælingaglösum fyrir sjálfvirkan sýnatakara við hlutfallið 1:10 annars vegar og 1:50 hins vegar. Ef botnfall kemur fram, vegna lítillar vatnsleysni prófunaríðefnisins, um leið og prófunaríðefnislausninni er bætt í peptíðlausnina er í því tilviki ekki hægt að vera viss um hversu mikið prófunaríðefni varð eftir í lausninni til að hvarfast við peptíðið. Í því tilviki er því enn hægt að nota jákvæða niðurstöðu en neikvæð niðurstaða er ótrygg og hana skal túlka með tilhlýðilegri varúð (sjá einnig ákvæðin í 11. lið sem varða prófanir á íðefnum sem eru ekki leysanleg í styrk sem nemur allt að 100 mM). Hvarflausnin skal skilin eftir í myrkri við 25 ± 2,5 °C í 24 ± 2 klst. áður en háþrýstivökvaskiljunargreiningin er keyrð. Gera skal þrefalda greiningu á hverju prófunaríðefni fyrir bæði peptíðin. Skoða þarf sýnin sjónrænt fyrir háþrýstivökvaskiljunargreiningu. Ef botnfall eða fasaskiljun kemur fram er hægt að skilja sýnin í skilvindu við lágan hraða (100-400 xg) til að þvinga botnfallið niður í botninn á mælingaglasinu í varúðarskyni þar eð mikið magn botnfalls getur stíflað leiðslur og súlur háþrýstivökvaskiljunnar. Ef útfelling eða fasaskiljun kemur fram eftir stöðutímabilið getur peptíðeyðing verið vanmetin og ef um er að ræða neikvæða niðurstöðu er ekki hægt að draga ályktun um skort á hvarfgirni með nægilegu öryggi.

Gerð staðlaðs kvörðunarferils fyrir háþrýstivökvaskiljun

Draga skal upp staðlaðan kvörðunarferil, bæði fyrir systeín- og lýsínpeptíðin. Peptíðstaðla skal tilreiða í lausn með 20 eða 25% asetónítríljafnalausn þar sem notuð er fosfatjafnalausn (pH-gildið 7,5) fyrir systeínpeptíðið og ammóníumasetatjafnalausn (pH-gildið 10,2) fyrir lýsínpeptíðið. Með því að nota raðþynningarstaðla fyrir peptíðstofnlausnina (0,667 mM) skal útbúa 6 kvörðunarlausnir til að ná yfir styrkbilin 0,534 til 0,0167 mM. Blanksýni af þynningarjafnalausninni skal einnig tekið með í staðlaða kvörðunarferlinum. Hentugur kvörðunarferill skal vera með $r^2 > 0,99$.

Undirbúningur háþrýstivökvaskiljunar og greiningar

Staðfesta skal hentugleika háþrýstivökvaskiljunarkerfisins áður en greiningin er framkvæmd. Peptíðeyðing er vöktuð með háþrýstivökvaskiljun með ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós (ljósnæmum díóðufjölnema eða gleypniskynjara með fastri bylgjulengd (e. *fixed wavelength absorbance detector*) með 220 nm merki). Viðeigandi súla er sett upp í háþrýstivökvaskiljunarkerfinu. Í uppsetningu háþrýstivökvaskiljunarinnar sem lýst er í fullgiltu aðferðarlýsingunni er Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 míkron notuð sem ákjósanlegasta súlan. Með þessari háþrýstivökvaskiljunarsúlu með óskautuðum stöðufasa skal jafnvægisstilla allt kerfið við 30 °C með 50% fasa A (0,1% (v/v)

tríflúoróediksýra í vatni) og 50% fasa B (0,085% (v/v) tríflúoróediksýra í asetónítríli) í a.m.k. 2 klst. fyrir keyrslu. Háþrýstivökvaskiljunargreiningin skal framkvæmd með því að nota streymi sem nemur 0,35 ml/mín. og línulegan stigul frá 10 til 25% asetónítríls í meira en 10 mínútur og þar á eftir hraða aukningu í 90% asetónítríls til að fjarlægja önnur efni. Jafn miklu magni af hverjum staðli, sýni og samanburði skal sprautað inn. Súlan skal endurjafnvægisstillt við upphafleg skilyrði í 7 mínútur milli innsprautana. Ef notuð er annars konar háþrýstivökvaskiljunarsúla með óskautuðum stöðufasa getur þurft að laga uppsetningarþættina sem lýst er hér að framan til að tryggja viðeigandi skolun og samlögun (e. *integration*) systeín- og lýsínpeptíða, þ.m.t. innsprautunarrúmmálið, sem getur verið breytilegt eftir kerfinu sem notað er (yfirleitt á bilinu 3–10 µl). Mikilvægt er að ef annars konar uppsetning háþrýstivökvaskiljunar er notuð skal sýna fram á jafngildi hennar við fullgiltu uppsetninguna sem lýst er hér á undan (t.d. með því að prófa hæfnisefnin í 2. viðbæti). Gleypni er vöktuð við 220 nm. Ef ljósnæmur díóðufjölnemi er notaður skal einnig skrá gleypni við 258 nm. Hafa skal í huga að einhverjar birgðir af asetónítríli gætu haft neikvæð áhrif á peptíðstöðugleikann og þetta verður að meta þegar ný framleiðslulota af asetónítríli er notuð. Hægt er að nota hlutfallið milli toppflatarmálsins 220 og toppflatarmálsins 258 sem mælikvarða um samtímis skolun. Að því er varðar hvert sýni er hlutfall á bilinu 90% < meðaltal ([1]) flatarmálshlutfall samanburðarsýna < 100% góð vísbending um að samtímis skolun hafi ekki orðið.

Það geta verið til prófunaríðefni sem gætu stuðlað að oxun systeínpeptíðanna. Hægt er að vakta toppgildi tvíliðaðra systeínpeptíða sjónrænt. Ef það lítur út fyrir að tvíliðun hafi orðið skal skrá það því hundraðshlutfall peptíðeyðingar gæti verið ofmetið sem leiðir til falsjákvæðra spáa og/eða flokkunar í hærri flokk hvarfgirni (sjá 29. og 30. lið).

Hægt er að framkvæma háþrýstivökvaskiljunargreiningu á systeín- og lýsínpeptíðum samtímis (ef tvö háþrýstivökvaskiljunarkerfi eru tiltæk) eða á mismunandi dögum. Ef greining er framkvæmd á mismunandi dögum skulu allar prófunaríðefnalausnir nýtilreiddar á hverjum degi fyrir báðar rannsóknir. Greiningin skal tímamæld til að tryggja að innsprautun á fyrsta sýninu hefjist 22–26 klst. eftir að prófunaríðefninu var blandað saman við peptíðlausnina. Keyrslurröð háþrýstivökvaskiljunarinnar skal sett upp þannig að greiningartíma hennar sé haldið undir 30 klst. Í þeirri uppsetningu háþrýstivökvaskiljunar, sem var notuð í fullgildingarrannsókninni og lýst í þessari prófunaraðferð, er hægt að hafa allt að 26 greiningarsýni í einni háþrýstivökvaskiljunarröð (sjá einnig 17. lið). Dæmi um greiningarröð háþrýstivökvaskiljunar er að finna í 3. viðbæti.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

Styrkur systeín- eða lýsínpeptíða er ákvarðaður með ljósmælingu við 220 nm í hverju sýni með því að mæla toppflatarmál (flatarmál undir ferli (AUC)) viðeigandi toppa og með því að reikna út styrk peptíðs með því að nota línulegan kvörðunarferil sem er leiddur út frá stöðlunum.

Hundraðshlutfall peptíðeyðingar er ákvarðað í hverju sýni með því að mæla toppflatarmálið og deila í það með meðaltali toppflatarmáls í viðeigandi viðmiðunarsamanburðum C (sjá 3. viðbæti) samkvæmt formúlunni sem er lýst hér á eftir.

$$\text{Hundraðshlutfall peptíðeyðingar} = \left[1 - \left(\frac{\text{Toppflatarmál peptíðs í samhliða prófunarinnsprautun}}{\text{Meðaltal toppflatarmáls peptíðs í viðmiðunarsamanburðum C}}\right)\right] \times 100$$

Samþykktarviðmiðanir

Eftirfarandi viðmiðanir skulu uppfylltar til að keyrsla teljist gild:

a) staðlaður kvörðunarferill skal vera með $r^2 > 0,99$,

([1]) Með meðaltali er átt við hreint meðaltal í öllu skjalinu.

b) meðalhundraðshlutfall peptíðeyðingargilda í samhliða prófununum þremur fyrir jákvæðan samanburð með sinnamínaldehýði skal vera á bilinu 60,8% til 100% fyrir systeínpeptíðið og á bilinu 40,2% til 69,0% fyrir lýsínpeptíðið og hámarksstaðalfrávik (SD) fyrir jákvæða samhliða samanburði skal vera < 14,9% fyrir hundraðshlutfall systeíneyðingar og < 11,6% fyrir hundraðshlutfall lýsíneyðingar og

c) meðaltal peptíðstyrks í viðmiðunarsamanburðum A skal vera 0,50 ± 0,05 mM og frávikstuðull (CV) toppflatarmáls peptíða fyrir viðmiðunarsamanburðina níu B og C í asetónítríli skal vera < 15,0%.

Sé ein eða fleiri þessara viðmiðana ekki uppfyllt skal endurtaka keyrsluna.

Eftirfarandi viðmiðanir skulu uppfylltar til að niðurstöður um prófunaríðefni teljist gildar:

a) hámarksstaðalfrávik samhliða prófana fyrir prófunaríðefnið skal vera < 14,9% fyrir hundraðshlutfall systeíneyðingar og < 11,6% fyrir hundraðshlutfall lýsíneyðingar,

b) meðaltal peptíðstyrks hinna þriggja viðmiðunarsamanburða C í viðeigandi leysi skal vera 0,50 ± 0,05 mM. Ef þessar viðmiðanir eru ekki uppfylltar skal hafna gögnunum og endurtaka keyrsluna fyrir þetta tiltekna prófunaríðefni.

Spálíkan

Meðalhundraðshlutfall eyðingargildis systeíns og lýsíns er reiknað út fyrir hvert prófunaríðefni. Litið er á neikvæða eyðingu sem „0“ þegar meðaltalið er reiknað. Með því að nota spálíkanið systeín 1:10/lýsín 1:50, sem sýnt er í töflu 1, ætti að nota þröskuldsgildi sem nemur 6,38% fyrir meðaltal peptíðeyðingar til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat. Notkun spálíkansins við að flokka prófunaríðefni í flokk hvarfgirni (þ.e. væg, í meðallagi eða mikil hvarfgirni) getur e.t.v. reynst gagnleg til grundvallar mati á næmingarmætti innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat.

Tafla 1

Spálíkan fyrir systeín1:10/lýsín 1:50 ([1])

Meðaltal systeín- og lýsíneyðingar í %	Flokkur hvarfgirni	Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð ([2])
0% ≤ meðaltal eyðingar í % ≤ 6,38%	Engin hvarfgirni eða lítilsháttar hvarfgirni	Neikvæð
6,38% < meðaltal eyðingar í % ≤ 22,62%	Lítil hvarfgirni	Jákvæð
22,62 % < meðaltal eyðingar í % ≤ 42,47 %	Hvarfgirni í meðallagi	
42,47 % < meðaltal eyðingar í % ≤ 100 %	Mikil hvarfgirni	

([1]) Tölurnar eiga við um tölfræðilega fengin þröskuldsgildi og tengjast ekki nákvæmni mælinganna.
([2]) Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. og 12. liðar.

Það geta komið upp tilvik þar sem prófunaríðefnið (efnið eða einn eða nokkrir efnisþættir fjölþáttaefnis eða -blöndu) frásogast umtalsvert við 220 nm og er með sama rástíma og peptíðið (skolun á sama tíma). Hægt er að ráða bót á samtímis skolun með því að breyta uppsetningu háþrýstivökvaskiljunarinnar örlítið til að aðskilja enn frekar skolunartíma prófunaríðefnisins og peptíðsins. Ef annars konar uppsetning háþrýstivökvaskiljunar er notuð til að reyna að ráða bót á skolun á sama tíma skal sýna fram á jafngildi hennar við fullgiltu uppsetninguna (t.d. með því að prófa hæfnisefnin í 2. viðbæti). Ef samtímis skolun verður er ekki hægt að sameina toppgildi peptíðsins og ekki mögulegt að reikna út hundraðshlutfall peptíðeyðingar. Ef samtímis skolun á slíkum prófunaríðefnum verður bæði með systeín- og lýsínpeptíðum skal greina frá greiningunni sem „ófullnægjandi“. Í tilvikum þar sem samtímis skolun tíma verður einungis með lýsínpeptíðinu er hægt að nota systeín 1:10-spálíkanið sem greint er frá í töflu 2.

Tafla 2

Spálíkan fyrir systeín1:10/ ([1])

Systeín (Cys) eyðing í %	Flokkur hvarfgirni	Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð ([2])
0% ≤ systeíneyðing í % ≤ 13,89%	Engin eða lítilsháttar hvarfgirni	Neikvæð
13,89% < systeíneyðing í % ≤ 23,09%	Lítil hvarfgirni	Jákvæð
23,09% < systeíneyðing í % ≤ 98,24%	Hvarfgirni í meðallagi	
98,24% < systeíneyðing í % ≤ 100%	Mikil hvarfgirni	

([1]) Tölurnar eiga við um tölfræðilega fengin þröskuldsgildi og tengjast ekki nákvæmni mælinganna.
([2]) Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. og 12. liðar.

Það geta komið upp önnur tilvik þar sem skörun á rástíma milli prófunaríðefnis og annars hvors peptíðanna er ófullnægjandi. Í slíkum tilvikum er hægt að áætla hundraðshlutfall eyðingargilda peptíðs og nota það í spálíkaninu systeín 1:10/lýsín 1:50; þó er ekki hægt að flokka prófunaríðefnið af nákvæmni í flokk hvarfgirni.

Ein háþrýstivökvaskiljunargreining fyrir bæði systeín- og lýsínpeptíðið ætti að nægja fyrir prófunaríðefnið þegar niðurstaðan er ótvíræð. Í tilvikum þar sem niðurstöður, sem eru nálægt þröskuldsgildinu, eru notaðar til að skilja á milli jákvæðra og neikvæðra niðurstaðna (þ.e. óvissar niðurstöður) getur verið nauðsynlegt að gera viðbótarprófun. Í aðstæðum þar sem meðalhundraðshlutfall eyðingar er á bilinu 3–10% fyrir spálíkanið systeín 1:10/lýsín 1:50 eða hundraðshlutfall systeíneyðingar er á bilinu 9–17% fyrir spálíkanið systeín 1:10 skal íhuga að gera aðra keyrslu sem og þriðju keyrsluna ef fyrstu keyrslurnar tvær gefa ósamhljóma niðurstöður.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni

Prófunaríðefni

— Efni með einum efnisþætti

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Útlit, vatnsleysni, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.

— Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

— Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda:

— Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér á undan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér á undan), að því marki sem unnt er.

— Útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.

— Sameindaþyngd eða sýndarsameindarþyngd ef um er að ræða blöndur/fjölliður af þekktri samsetningu eða aðrar upplýsingar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar.

— Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

Samanburðir

— Jákvæður samanburður

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Útlit, vatnsleysni, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.

— Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

— Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur, ef við á.

— Leysir/burðarefni

— Leysir/burðarefni sem notað er og hlutfall efnisþátta þess, ef við á.

— Efnafræðileg(ar) sanngreining(ar) s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer og/eða aðrar auðkenningar.

— Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

— Útlit, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, ef aðrir leysar/önnur burðarefni eru notuð en þau sem getið er um í prófunaraðferðinni og að því marki sem unnt er.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi fyrir hvert prófunaríðefni.

— Fyrir asetónítríl: niðurstöður úr prófun á áhrifum á stöðugleika peptíðs.

Tilreiðsla peptíða, jákvæður samanburður og prófunaríðefni

— Lýsing á eiginleikum peptíðlausna (birgir, framleiðslulota, nákvæm þyngd peptíða, rúmmál sem bætt er við stofnlausnina).

— Lýsing á eiginleikum jákvæðrar samanburðarlausnar (nákvæm þyngd jákvæðra samanburðarefna, rúmmál sem bætt er við prófunarlausnina).

— Lýsing á eiginleikum prófunaríðefnalausnar (nákvæm þyngd prófunaríðefnis, rúmmál sem bætt er við prófunarlausnina).

Stilling háþrýstivökvaskiljunartækja og greining

— Tegund háþrýstivökvaskiljunartækis, háþrýstivökvaskiljunarsúlur og forsúlur, nemi, sjálfvirkur sýnatakari.

— Mæliþættir sem skipta máli fyrir háþrýstivökvaskiljunargreininguna, s.s. hitastig súlu, innsprautunarrúmmál, streymi og stigull.

Hentugleiki kerfis

— Toppflatarmál peptíðs við 220 nm fyrir hvern staðal og samhliða prófun viðmiðunarsamanburðar A.

— Línulegur kvörðunarferill sýndur á myndrænan hátt og greint frá r^2.

— Peptíðstyrkur í hverri samhliða prófun viðmiðunarsamanburðar A.

— Meðaltal peptíðstyrks (mM) hinna þriggja viðmiðunarsamanburða A: hámarksstaðalfrávik (SD) og frávikstuðull (CV).

— Peptíðstyrkur viðmiðunarsamanburða A og C.

Greiningarröð

— Fyrir viðmiðunarsamanburði:

  — Toppflatarmál peptíðs við 220 nm fyrir hverja samhliða prófun B og C.

  — Meðaltal toppflatarmáls peptíðs við 220 nm fyrir viðmiðunarsamanburðina níu B og C í asetónítríli, hámarksstaðalfrávik (SD) og frávikstuðul (CV) (m.t.t. stöðugleika viðmiðunarsamanburða á greiningartímanum).

  — Fyrir hvern leysi sem er notaður, meðaltal toppflatarmáls peptíðs við 220 nm fyrir hina þrjá viðeigandi viðmiðunarsamanburði C (til að reikna út hundraðshlutfall peptíðeyðingar).

  — Fyrir hvern leysi sem er notaður, peptíðstyrkur (mM) hinna þriggja viðeigandi viðmiðunarsamanburða C.

  — Fyrir hvern leysi sem er notaður, meðaltal peptíðstyrks (mM) hinna þriggja viðeigandi viðmiðunarsamanburða C, hámarksstaðalfrávik (SD) og frávikstuðul (CV).

— Fyrir jákvæðan samanburð:

  — Toppflatarmál peptíðs við 220 nm fyrir hverja samhliða prófun.

  — Hundraðshlutfall peptíðeyðingar fyrir hverja samhliða prófun.

  — Meðalhundraðshlutfall peptíðeyðingar hinna þriggja samhliða prófana, hámarksstaðalfrávik (SD) og frávikstuðul (CV).

— Fyrir hvert prófunaríðefni:

  — Birting botnfalls í hvarfblöndunni við lok stöðutímans, ef það kemur fram. Hvort botnfall var leyst upp aftur eða skilið í skilvindu.

— Skolun á sama tíma er fyrir hendi.

— Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

— Toppflatarmál peptíðs við 220 nm fyrir hverja samhliða prófun.

— Hundraðshlutfall peptíðeyðingar fyrir hverja samhliða prófun.

— Meðalhundraðshlutfall peptíðeyðingar hinna þriggja samhliða prófana, hámarksstaðalfrávik (SD) og frávikstuðul (CV).

— Meðalhundraðshlutfall eyðingargilda systeíns og lýsíns.

— Spálíkan sem er notað og spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð.

Hæfnisprófun

— Ef við á, verklagið sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunaraðferðina (t.d. með prófun á hæfnisefnum) eða til að sýna fram á samanburðarnákvæma framkvæmd prófunaraðferðarinnar yfir lengri tíma.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

— Umfjöllun um niðurstöður sem fást með beinu prófuninni á hvarfgirni við peptíð.

— Umfjöllun um niðurstöður prófunaraðferðarinnar með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

Ályktun

HEIMILDIR:

1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

3) Kafli B.6 í þessum viðauka: Húðnæming.

4) Kafli B.42 í þessum viðauka: Eitlagreining

5) Kafli B.50 í þessum viðauka: Húðnæming: DA-eitlagreining.

6) Kafli B.51 í þessum viðauka: Húðnæming. Eitlagreining BrdU-ELISA

7) Adler *et al*. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

8) Gerberick *et al*. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

9) Gerberick *et al*. (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Aðgengilegt á: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

11) Jaworska *et al*. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

13) Nukada *et al*. (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Aðgengilegt á: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Aðgengilegt á: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf - 138

23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (21. heimild).

Ferli neikvæðra afleiðinga (AOP) Röð atburða, frá efnafræðilegri byggingu markíðefnis, eða hóps svipaðra íðefna, um sameindaræsingu að niðurstöðu, sem miðað er við, í lífi (2. heimild).

Kvörðunarferill: Samband milli tilraunarsvörunargildis og greiningarstyrks (einnig kallað staðalferill) þekkts efnis.

Íðefni: Efni eða blanda.

Frávikstuðull: Mæling á breytileika sem er reiknaður út fyrir hóp gagna úr samhliða prófun með því að deila í staðalfrávikið með meðaltalinu. Hægt er að margfalda hann með 100 til að gefa hann upp sem hundraðshluta.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur kemst í snertingu við það efni.

Samþætt aðferð við prófun og mat (IATA): Skipulögð aðferð sem er notuð til hættugreiningar (hugsanlegrar), hættulýsingar (máttur) og/eða öryggismats (hugsanleg(ur)/máttur og váhrif) á íðefnum eða hópi íðefna, sem samþættar og vegur skipulega öll gögn sem skipta máli til grundvallar eftirlitsákvörðunum sem varða hugsanlega hættu og/eða áhættu og/eða þörf á nákvæmari og þar af leiðandi færri prófunum

Sameindaræsing: Truflun, af völdum íðefna, á sameindastigi lífræns kerfis sem staðfest er að sé upphafsatburðurinn í ferli neikvæðra afleiðinga.

Blanda: Tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í (1. heimild).

Efni með einum efnisþætti: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

Fjölþáttaefni: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur ≥ 10% (massahlutfall) og < 80 % (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

Jákvæður samanburður: Samhliða prófun sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndluð með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

Viðmiðunarsamanburður: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og er unnið með sýnum, sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu, og með öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða, neikvæðu samanburðarsýni sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Gildi: Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (21. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (21. heimild).

Samanburðarnákvæmni: Samkvæmni í niðurstöðum sem fást með prófunum á sama íðefninu með því að nota sömu aðferðarlýsingu prófunar (sjá áreiðanleika) (21. heimild).

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (21. heimild).

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (21. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar, og óhreinindi, sem verða til í vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem hægt er að skilja frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess (1. heimild).

Hentugleiki kerfis: Ákvörðun á hæfni tækis (t.d. næmi) með greiningu á viðmiðunarstaðli áður en greiningarlotan er keyrð (22. heimild).

Prófunaríðefni: Íðorðið „prófunaríðefni“: er notað um það sem verið er að prófa.

Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SÞ): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendum, launafólki, flytjendum, neytendum og bráðaliðum) og umhverfinu (1. heimild).

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Fullgild prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófunaraðferð er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (21. heimild).

———

2. viðbætir

HÆFNISEFNI

***Húðnæming í efni:* Bein prófun á hvarfgirni við peptíð**

Áður en aðferðin, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að fá rétta þá spá sem búist er við með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð fyrir hæfnisefnin 10, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram systeín- og lýsíneyðingargildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbils fyrir 8 af hverjum 10 hæfnisefnum fyrir hvert peptíð. Þau efni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu. Aðrar valviðmiðanir voru þær að efnin fengjust á almennum markaði, að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og hágæðagögn um rannsóknir í glasi, sem verða til með beinu prófuninni á hvarfgirni við peptíð, séu tiltæk og að þau hafi verið notuð í samræmdri fullgildingarrannsókn tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins og Evrópumiðstöðinni um fullgildingu staðgönguaðferða (EURL ECVAM) til að sýna fram á árangursríka framkvæmd prófunaraðferðarinnar á rannsóknarstofunum sem tóku þátt í rannsókninni.

Tafla 1

Hæfnisefni sem mælt er með til að sýna fram á tæknilega færni með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá í lífi ([1])	Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð ([2])	Bil ([3]) systeínpeptíð-eyðingar í %	Bil ([3]) lýsínpeptíð-eyðingar í %
2,4-dínítróklóró-bensen	97-00-7	Fast efni	Næmir (mjög mikill)	Jákvæð	90–100	15–45
Oxasólón	15646-46-5	Fast efni	Næmir (mjög mikill)	Jákvæð	60–80	10–55
Formaldehýð	50-00-0	Vökvi	Næmir (sterkur)	Jákvæð	30–60	0–24
Bensýlídenasetón	122-57-6	Fast efni	Næmir (í meðallagi)	Jákvæð	80–100	0–7
Farnesal	19317-11-4	Vökvi	Næmir (vægur)	Jákvæð	15-55	0-25
2,3-bútandíón	431-03-8	Vökvi	Næmir (vægur)	Jákvæð	60–100	10–45
1-bútanól	71-36-3	Vökvi	Ekki næmir	Neikvæð	0–7	0–5,5
6-metýlkúmarín	92-48-8	Fast efni	Ekki næmir	Neikvæð	0–7	0-5,5

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá í lífi ([1])	Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð ([2])	Bil ([3]) systeínpeptíð-eyðingar í %	Bil ([3]) lýsínpeptíð-eyðingar í %
Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	Ekki næmir	Neikvæð	0–7	0–5,5
4-metoxýasetófenón	100-06-1	Fast efni	Ekki næmir	Neikvæð	0–7	0–5,5

([1]) Spár um hættu í lífi og (mátt) byggjast á eitlagreiningargögnum (19. heimild). Máttur í lífi er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumiðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (23. heimild).

([2]) Spá með beinni prófun á hvarfgirni við peptíð skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. og 12. liðar.

([3]) Bil eru ákvörðuð á grundvelli a.m.k. 10 eyðingargilda sem verða til hjá 6 óháðum rannsóknarstofum.

3. viðbætir

DÆMI UM GREININGARRÖÐ

Kvörðunarstaðlar og viðmiðunarsamanburðir	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Þynningarjafnalausn Viðmiðunarsamanburður A, samhl. pr. 1 Viðmiðunarsamanburður A, samhl. pr. 2 Viðmiðunarsamanburður A, samhl. pr. 3
Samanburðir vegna skolunar á sama tíma	Samanburður 1 vegna skolunar á sama tíma fyrir prófunaríðefni 1 Samanburður 2 vegna skolunar á sama tíma fyrir prófunaríðefni 2
Viðmiðunarsamanburðir	Viðmiðunarsamanburður B, samhl. pr. 1 Viðmiðunarsamanburður B, samhl. pr. 2 Viðmiðunarsamanburður B, samhl. pr. 3
Fyrsta sett samhliða prófana	Viðmiðunarsamanburður C, samhl. pr. 1 Sinnamínaldehýð, samhl. pr. 1 Sýni 1, samhl. pr. 1 Sýni 2, samhl. pr. 1
Annað sett samhliða prófana	Viðmiðunarsamanburður C, samhl. pr. 2 Sinnamínaldehýð, samhl. pr. 2 Sýni 1, samhl. pr. 2 Sýni 2, samhl. pr. 2
Þriðja sett samhliða prófana	Viðmiðunarsamanburður C, samhl. pr. 3 Sinnamínaldehýð, samhl. pr. 3 Sýni 1, samhl. pr. 3 Sýni 2, samhl. pr. 3
Viðmiðunarsamanburðir	Viðmiðunarsamanburður B, samhl. pr. 4 Viðmiðunarsamanburður B, samhl. pr. 5 Viðmiðunarsamanburður B, samhl. pr. 6

Þrjú sett viðmiðunarsamanburða (þ.e. sýni sem eru einungis peptíð leyst upp í viðeigandi leysi) skulu tekin með í greiningarröðina:
Viðmiðunarsamanburður A: notaður til að staðfesta hentugleika háþrýstivökvaskiljunarkerfisins.
Viðmiðunarsamanburður B: tekinn með í upphafi og í lok greiningarraðar til að staðfesta stöðugleika viðmiðunarsamanburða á greiningartímanum.
Viðmiðunarsamanburður C: tekinn með í greiningarröðinni til að staðfesta að leysirinn, sem er notaður til að leysa prófunaríðefnið upp, hafi ekki áhrif á hundraðshlutfall peptíðeyðingar.

B.60 *Húðnæming í glasi:* **Prófunaraðferð með ARE-Nrf2-lúsíferasa**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 442D um prófanir (2015). Með húðnæmi er átt við efni sem leiðir til ofnæmissvörunar í kjölfar snertingar við húð, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) (1. heimild) og reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna (reglugerð (EB) nr. 1272/2008) ([1]). Þessi prófunaraðferð felur í sér prófun í glasi (greiningin með ARE-Nrf2 lúsíferasa) sem á að nota til stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi í samræmi við hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK-SÞ) (1. heimild) og reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

Almennt samkomulag er um helstu líffræðilegu atburði sem liggja að baki húðnæmingu. Fyrirliggjandi þekking á efnafræðilegu og líffræðilegu gangvirki sem tengist húðnæmingu hefur verið tekin saman í formi ferlis neikvæðra afleiðinga (2. heimild), frá sameindaræsingunni, um milliatburðina, að neikvæðu áhrifunum á heilbrigði, þ.e.a.s. húðbólgu vegna snertiofnæmis hjá mönnum eða snertiofurnæmi hjá nagdýrum (2. og 3. heimild). Sameindaræsing er samgild tenging rafsækinna efna við sameindasækna miðju húðprótína. Annar lykilatburðurinn í þessu ferli neikvæðra afleiðinga fer fram í hyrnisfrumum og nær yfir bólguviðbrögð sem og genatjáningu sem tengist tilteknum boðleiðum frumna (e. *cell signalling pathway*), t.d. ferli sem eru háð svörunarseti andoxunarefna/rafsækinna efna (ARE)) (e. *antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways*). Þriðji lykilatburðurinn er virkjun angafruma, yfirleitt metin með tjáningu sértækra frumuyfirborðsmarka, flakkboða og frumuboða. Fjórði lykilatburðurinn er fjölgun T-frumna sem er metin óbeint í eitlagreiningu á músum (4. heimild).

Mat á húðnæmingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra. Sígildu aðferðirnar „Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GMPT)“ (hámörkunarprófun á naggrísum) og „Buehler-prófun“ (prófunaraðferð B.6 (5. heimild)), sem byggjast á naggrísum, eru notaðar til að rannsaka bæði örvunar- og framköllunarstig húðnæmingar. Músaprófun, eitlagreining (LLNA), (prófunaraðferð B.42 (4. heimild)) og ógeislavirku, breyttu aðferðirnar tvær, LLNA: DA (prófunaraðferð B.50 (6. heimild)) og LLNA: BrdU-ELISA (prófunaraðferð B.51 (7. heimild)), sem allar meta eingöngu viðbrögð við örvun, hafa einnig hlotið viðurkenningu því þær eru fremri prófunum á naggrísum, bæði með tilliti til velferðar dýra og sem hlutlæg mæling á örvunarstigi húðnæmingar.

Nýlega hafa prófunaraðferðir sem byggja á gangvirkjum í prófunum í efni og í glasi talist vísindalega gildar til að meta húðnæmingarhættu íðefna. Þó verður þörf á samsettum aðferðum án tilrauna á dýrum (í tölvulíkani, í efni, í glasi) innan samþættra aðferða við prófun og mat (IATA) til að unnt sé að skipta að öllu leyti út þeim prófunum á dýrum sem eru sem stendur í notkun, í ljósi takmarkana allra prófunaraðferða án dýra, sem eru tiltækar, á umfjöllunarsviði um ferli neikvæðra afleiðinga (2. og 3. heimild).

Þessari prófunaraðferð (greining með ARE-Nrf2-lúsíferasa) er ætlað að fjalla um annan lykilatburðinn eins og útskýrt er í 2. lið. Skýrt hefur verið frá því að húðnæmar virkji gen sem stjórnast af svörunarseti andoxunarefna (ARE) (8. og 9. heimild). Smærri rafsækin efni, s.s. húðnæmar, geta haft áhrif á skynjaraprótínið Keap1 (Kelch-lík ECH-tengt prótín 1), t.d. með samgildri breytingu á systeínleif þess sem leiðir til klofnunar þess frá umritunarþættinum Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Nrf2-þátturinn sem klofnar frá getur þá virkjað ARE-háð gen, s.s. þau sem kóða fyrir afeitrandi ensím II. fasa (8. 10. og 11. heimild).

Sem stendur er greiningin KeratinoSens™ eina *í glasi* greiningin með ARE-Nrf2-lúsíferasa, sem fellur inn í þessa prófunaraðferð, sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir (9., 12. og 13. heimild) og hefur í kjölfarið fengið óháða jafningjarýni hjá tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins fyrir annars konar aðferðir en prófanir á dýrum (EURL ECVAM) (14. heimild). Greiningin KeratinoSens™ taldist vísindalega traust til notkunar sem hluti af samþættri aðferð við prófun og mat til stuðnings til að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi til hættuflokkunar og merkingar (14. heimild). Rannsóknarstofur sem eru viljugar til að nota prófunaraðferðina geta fengið endurröðuðu frumulínuna, sem er notuð í greiningunni KeratinoSens™, með því að koma á leyfissamningi við þann sem þróaði prófunaraðferðina (15. heimild).

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

Skilgreiningar eru gefnar í 1. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, NOTHÆFI OG TAKMARKANIR

Þar eð virkjun Keap1-Nrf2-ARE-ferlisins snertir einungis annan lykilatburðinn innan ferlis neikvæðra afleiðinga (AOP) er ólíklegt að upplýsingar úr prófunaraðferðum, sem byggjast á virkjun þessa ferlis, séu fullnægjandi þegar þær eru notaðar einar og sér til að draga ályktun um húðnæmingarmátt íðefna. Þess vegna ætti að taka gögn, sem verða til með þessari prófunaraðferð, til athugunar í tengslum við samþættar aðferðir, s.s. samþætta aðferð við prófun og mat, sameina þær öðrum viðbótarupplýsingum sem t.d. fást með greiningum í glasi þar sem fengist er við aðra lykilatburði innan ferlis neikvæðra afleiðinga sem valda húðnæmingu sem og úr aðferðum án prófana, þ.m.t. ályktunum út frá byggingarlega hliðstæðum efnum um efnafræðilega hliðstæð efni. Dæmi um hvernig á að nota prófunaraðferðina með ARE-Nrf2-lúsíferasa í samsetningu með öðrum upplýsingum eru tilgreind í heimildum (13., og 16.–19. heimild).

Hægt er að nota þessa prófunaraðferð til stuðnings við að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki húðnæmandi með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat. Þessa prófunaraðferð er ekki hægt að nota eina og sér, hvorki til að undirflokka húðnæma í undirundirflokk 1A og 1B, eins og skilgreint er í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, né til að spá fyrir um mátt vegna ákvarðana um öryggismat. Þó er hægt að nota jákvæða niðurstöðu eina og sér til að flokka íðefni í 1. undirflokk HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008, háð reglurammanum.

Greiningin KeratinoSens™ reyndist yfirfæranleg til rannsóknarstofa sem hafa reynslu af frumuræktum, byggt á gagnasafninu úr fullgildingarrannsókninni og innanhússprófununum, sem voru notuð í óháðu jafningjarýninni á prófunaraðferðinni. Búast má við að samanburðarnákvæmni spáa sem fást með prófunaraðferðinni sé við 85% markið innan og milli rannsóknarstofa (14. heimild). Nákvæmni (77% – 155/201), næmi (78% – 71/91) og sértæki (76% – 84/110) greiningarinnar KeratinoSens™ til að skilja á milli húðnæma (þ.e. 1. undirflokkur HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) og efna sem eru ekki húðnæmandi, í samanburði við niðurstöður úr eitlagreiningu, voru reiknuð út með því að vega og meta öll gögn sem lögð voru fyrir tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins og Evrópumiðstöðina um fullgildingu staðgönguaðferða (EURL ECVAM) vegna mats og jafningjarýni á prófunaraðferðinni (14. heimild). Þessar tölur eru svipaðar og tölur sem voru birtar nýlega, byggðar á innanhússprófunum á u.þ.b. 145 efnum (77% nákvæmni, 79% næmi, 72% sértæki) (13. heimild). Líklegra er að greiningin KeratinoSens™ vanmeti íðefni sem sýna vægan húðnæmingarmátt eða húðnæmingarmátt í meðallagi (þ.e. undirundirflokkur 1B í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) en íðefni sem sýna mikinn húðnæmingarmátt (þ.e. undirundirflokkur 1A í HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) (13. og 14. heimild). Þegar þessar upplýsingar eru teknar saman benda þær til þess að greiningin KeratinoSens™ sé gagnleg til að stuðla að því að greina áhættu á húðnæmingu. Þó eru gildin fyrir nákvæmni, sem hér eru gefin fyrir greininguna KeratinoSens™ sem sjálfstæða prófunaraðferð, einungis leiðbeinandi þar eð líta ætti á prófunaraðferðina í samsetningu með öðrum upplýsingum með skírskotun til samþættra aðferða við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. liðar hér að framan. Þegar aðferðir, án tilrauna á dýrum, vegna húðnæmingar eru metnar ætti enn fremur að hafa í huga að eitlagreining, sem og aðrar prófanir á dýrum, endurspegla e.t.v. ekki að fullu aðstæður hjá tegundinni sem miðað er við, þ.e. menn.

Heitið „prófunaríðefni“ er notað í þessari prófunaraðferð til að vísa til þess sem verið er að prófa og tengist ekki nothæfi aðferðarinnar með ARE-Nrf2-lúsíferasa til prófunar á efnum og/eða blöndum. Á grundvelli núverandi gagna sem liggja fyrir reyndist greiningin KeratinoSens™ nothæf fyrir prófunaríðefni sem falla undir mismunandi hópa virkra lífrænna efna, gangvirki hvarfa, húðnæmingarmátt (eins og ákvarðað er með rannsóknum í lífi) og eðlisefnafræðilega eiginleika (9. og 12.–14. heimild). Aðallega voru prófuð efni með einum efnisþætti en þó er einnig til takmarkað magn gagna um prófanir á blöndum (20. heimild). Tæknilega séð telst prófunaraðferðin samt sem áður nothæf til prófunar á fjölþáttaefnum og blöndum. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal þó skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda. Við prófanir á fjölþáttaefnum eða blöndum skal enn fremur einnig kanna hugsanlegar truflanir frumueitrandi efnisþátta á mælda svörun. Prófunaraðferðin hentar fyrir prófunaríðefni sem eru leysanleg eða sem mynda stöðuga dreifilausn (þ.e. með svifögnum eða í sviflausn þar sem prófunaríðefnið sest ekki eða skilur sig frá leysinum í mismunandi fasa), annaðhvort í vatni eða dímetýlsúlfoxíði (þetta á við um alla efnisþætti prófunaríðefnis ef um er að ræða prófun á fjölþáttaefni eða blöndu). Þó er hægt að prófa prófunaríðefni, sem uppfylla ekki þessi skilyrði við hæsta nauðsynlega lokastyrk sem nemur 2000 μM (sjá

22. lið), við lægri styrk. Í því tilviki er þó enn hægt að nota niðurstöður, sem uppfylla viðmiðanir fyrir jákvæðni sem lýst er í 39. lið, til að styðja greiningu prófunaríðefnisins sem húðnæmis; hins vegar skal líta á neikvæða niðurstöðu, sem fæst með styrkleikum < 1000 µM, sem óvissa niðurstöðu (sjá spálíkan í 39. lið). Alla jafna hafa efni með LogP allt að 5 verið prófuð með góðum árangri; hins vegar eru mjög vatnsfælin efni með LogP yfir 7 utan þekkts notkunarsviðs prófunaraðferðarinnar (14. heimild). Að því er varðar efni með LogP á bilinu 5 til 7 eru einungis takmarkaðar upplýsingar fyrirliggjandi.

Túlka skal neikvæðar niðurstöður með varúð því efni, sem eru einungis hvarfgjörn gagnvart lýsínleifum, geta greinst sem neikvæð með prófunaraðferðinni. Vegna takmarkaðrar efnaskiptagetu frumulínunnar sem er notuð (21. heimild) og vegna tilraunaskilyrðanna geta lífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. íðefni sem útheimta ensímvirkjun, t.d. fyrir milligöngu P450-ensíma), og ólífrænt umbreyttir meðvakar (þ.e. íðefni sem virkjast með sjálfsoxun), einkum með hægum oxunarhraða, enn fremur gefið neikvæðar niðurstöður. Prófunaríðefni sem eru ekki næmandi en eru samt sem áður efnafræðilegir streituvaldar geta á hinn bóginn leitt til falsjákvæðra niðurstaðna (14. heimild). Enn fremur er ekki alltaf hægt að meta mjög frumueitrandi íðefni á áreiðanlegan hátt. Að lokum geta prófunaríðefni, sem hafa áhrif á lúsíferasaensímið, truflað virkni lúsíferasa í frumumiðuðum greiningum og valdið annað hvort sýnilegri hömlun eða aukinni ljómun (22. heimild). Til dæmis var greint frá því að plöntuestrógenstyrkur yfir 1 µM hefði áhrif á ljómunarmerki í öðrum lúsíferasamiðuðum vísigenagreiningum vegna ofvirkjunar á vísigeni lúsíferasans (23. heimild). Af þessu leiðir að lúsíferasatjáningu, sem fæst við háan styrk plöntuestrógena eða svipaðra íðefna sem grunur leikur á um að myndi plöntuestrógenlíka ofvirkjun á vísigeni lúsíferasa (23. heimild), þarf að rannsaka vandlega. Í tilvikum þar sem unnt er að sýna fram á að prófunaraðferðin sé ekki nothæf fyrir aðra tiltekna flokka prófunaríðefna skal ekki nota prófunaraðferðina fyrir þessa tilteknu flokka.

Auk stuðnings við að skilja á milli húðnæma og efna sem eru ekki húðnæmandi veitir greiningin KeratinoSens™ einnig upplýsingar um tengsl milli styrks og svörunar sem geta hugsanlega stuðlað að matinu á næmingarmætti þegar hún er notuð í samþættum aðferðum, s.s. samþættri aðferð við prófun og mat (19. heimild). Þó er þörf á frekari vinnu, helst á grundvelli áreiðanlegra gagna um menn, til að ákvarða hvernig niðurstöður úr greiningunni KeratinoSens™ geta stuðlað að mati á næmingargetu (24. heimild) og undirflokkun næma samkvæmt HSK-SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Í prófunaraðferðinni með ARE-Nrf2-lúsíferasa er notuð frumulína sem hefur verið gerð ódauðleg og hefur frumuviðloðun, fengin úr HaCaT-hyrnisfrumum, úr mönnum með innleitt veljanlegt plasmíð sem er stöðugt. Frumulínan inniheldur lúsíferasagenið undir umritunarstjórn sívirks stýrils, skeyttu saman við ARE-þátt úr geni sem vitað er að snertinæmandi efni auka tjáningu á (e. *up-regulate*) (25. og 26. heimild). Lúsíferasamerkið endurspeglar virkjun næmandi efna á innrænum Nrf2-háðum genum og sýnt hefur verið fram á Nrf2-hæði lúsíferasamerkisins í endurröðuðu frumulínunni (27. heimild). Þetta gerir það kleift að gera megindlegar mælingar (með ljómunargreiningu) á vakningu lúsíferasagena með því að nota vel þekkt ljósgefandi lúsíferasahvarfefni sem mælikvarða á virkni umritunarþáttarins Nrf2 í frumum eftir váhrif frá rafsæknum efnum.

Prófunaríðefni eru talin valda jákvæðri svörun í greiningunni KeratinoSens™ ef þau kalla fram tölfræðilega marktæka vakningu lúsíferasavirkni yfir tilteknum viðmiðunarmörkum (þ.e. 1,5-föld eða 50% aukning), undir skilgreindum styrk sem hefur ekki marktæk áhrif á lífvænleika fruma (þ.e. undir 1000 µM og í styrk þar sem lífvænleiki frumna er yfir 70% (9. og 12. heimild)). Í þessu skyni er ákvörðuð hámarksmargfeldi vakningar lúsíferasavirkninnar samanborið við samanburð (neikvæðan) með leysi (I_{max}). Þar eð frumur verða fyrir váhrifum af prófunaríðefnunum í röð styrkleika skal enn fremur innreikna þann styrk sem þarf fyrir tölfræðilega marktæka vakningu lúsíferasavirkni yfir viðmiðunarmörkunum (þ.e. $EC_{1,5}$-gildi) út frá skammtasvörunarferlinum (sjá útreikninga í 32. lið). Að lokum skal gera samhliða mælingar á frumueiturhrifum til að meta hvort vakning lúsíferasavirkni komi fram við styrk sem er undir frumueitrandi styrk.

Áður en greining með ARE-Nrf2-lúsíferasa, sem fylgir þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur staðfesta tæknilega hæfni sína með hæfnisefnunum 10 sem eru tilgreind í 2. viðbæti.

Nothæfisstaðlar (28. heimild) eru fáanlegir til að auðvelda fullgildinguna á nýjum eða breyttum *í glasi* prófunaraðferðum með ARE-Nrf2-lúsíferasa, svipuðum og greiningin KeratinoSens™, og þeir gefa færi á tímanlegum breytingum á þessari prófunaraðferð til að fella þær inn. Aðeins er hægt að tryggja gagnkvæma samþykkt gagna (MAD), samkvæmt samkomulagi Efnahags- og framfarastofnunarinnar, fyrir prófunaraðferðir sem eru fullgiltar samkvæmt nothæfisstöðlunum ef þær prófunaraðferðir hafa verið endurskoðaðar og felldar inn í samsvarandi viðmiðunarreglu OECD um prófanir.

VERKFERLI

Sem stendur er vísindalega trausta greiningin KeratinoSens™ eina aðferðin sem fellur inn í þessa prófunaraðferð (9. og 12.–14. heimild). Staðlaðar verklagsreglur fyrir greininguna KeratinoSens™ eru fáanlegar og skulu notaðar þegar prófunaraðferðin er innleidd og notuð á rannsóknarstofunni (15. heimild). Rannsóknarstofur sem eru viljugar til að nota prófunaraðferðina geta fengið endurröðuðu frumulínuna, sem er notuð í greiningunni KeratinoSens™, með því að koma á leyfissamningi við þann sem þróaði prófunaraðferðina. Í liðunum hér á eftir er lýsing á helstu þáttum og tilhögun prófunaraðferðarinni með ARE-Nrf2-lúsíferasa .

Tilreiðsla hyrnisfrumuræktanna

Nota skal genskeytta frumulínu með stöðugt innskot lúsíferasavísigens undir stjórn ARE-þáttarins (t.d. frumulínu KeratinoSens™). Við móttöku eru frumurnar látnar fjölga sér (t.d. 2–4 umsáningar) og geymdar frosnar sem einsleitur stofn. Hægt er að láta frumur úr þessum upphaflega stofni fjölga sér í allt að hámarksfjölda umsáninga (þ.e. 25 ef um er að ræða KeratinoSens™) og þær eru notaðar í venjubundnar prófanir með notkun viðeigandi viðhaldsætis (ef um er að ræða KeratinoSens™ er það DMEM sem inniheldur sermi og Geneticin).

Við prófun skulu frumurnar vera 80–90% samfelldar og þess skal gætt að tryggja að frumur séu aldrei ræktaðar þannig að þær séu fullkomlega samfelldar. Daginn fyrir prófun eru frumurnar heimtar og þeim dreift í bakka með 96 holum (10 000 frumur/holu ef um er að ræða KeratinoSens™). Gefa skal gaum að því að forðast að frumurnar botnfalli við sáninguna til að tryggja jafna dreifingu frumufjöldans í holunum. Ef svo er ekki getur þetta þrep valdið miklum breytileika milli hola. Notuð eru þrjú samskonar sýni til að mæla virkni lúsíferasa í hverri endurtekningu og eitt samskonar sýni samhliða til að greina lífvænleika frumna.

Tilreiðsla prófunaríðefna og samanburðarefna

Prófunaríðefni og samanburðaefni eru tilreidd á prófunardegi. Að því er varðar greininguna KeratinoSens™ eru prófunaríðefnin leyst upp í dímetýlsúlfoxíði í þann lokastyrk sem óskað er eftir (t.d. 200 mM). Hægt er að líta svo á að dímetýlsúlfoxíðlausnir séu sjálfdauðhreinsandi þannig að dauðhreinsun með síun er óþörf. Prófunaríðefni, sem er ekki leysanlegt í dímetýlsúlfoxíði, er leyst upp í dauðhreinsuðu vatni eða ræktunaræti og lausnirnar dauðhreinsaðar, t.d. með síun. Að því er varðar prófunaríðefni sem er ekki með skilgreinda sameindaþyngd er tilreidd stofnlausn með sjálfgefnum styrk (40 mg/mL eða 4% (massi miðað við rúmmál)) í greiningunni KeratinoSens™. Ef notaðir eru aðrir leysar en dímetýlsúlfoxíð, vatn eða ræktunaræti skal færa fullnægjandi vísindaleg rök fyrir því.

Gerðar eru raðþynningar, byggðar á dímetýlsúlfoxíðstofnlausnum prófunaríðefnisins, með því að nota dímetílsúlfoxíð til að fá 12 aðalstyrkleika prófunaríðefnisins sem á að prófa (frá 0,098 til 200 mM í greiningunni KeratinoSens™). Að því er varðar prófunaríðefni sem er ekki leysanlegt í dímetýlsúlfoxíði eru þynningarnar, til að fá fram aðalstyrkleikana, gerðar með því að nota dauðhreinsað vatn eða dauðhreinsað ræktunaræti. Óháð leysinum sem er notaður eru aðalstyrkleikarnir síðan þynntir enn frekar, 25-falt í ræktunaræti sem inniheldur sermi, og loks notaðir til meðhöndlunar með frekari 4-földum þynningarstuðli þannig að endanlegur styrkur prófaðs íðefnis sé á bilinu 0,98 til 2000 µM í greiningunni KeratinoSens™. Nota má aðra styrkleika ef rök eru færð fyrir því (t.d. ef um er að ræða frumueiturhrif eða litla leysni).

Neikvæði (leysir) samanburðurinn, sem er notaður í greiningunni KeratinoSens™, er dímetýlsúlfoxíð (CAS nr. 67-68-5, ≥ 99% hreinleiki) og tilreitt í 6 holur með honum á hverjum bakka. Hann er þynntur á sama hátt og lýst er varðandi aðalstyrkleikana í 22. lið þannig að endanlegur styrkur neikvæðs (leysir) samanburðar er 1%, sem vitað er að hafi ekki áhrif á lífvænleika fruma og svarar til sama styrkleika dímetýlsúlfoxíðs og er að finna í prófaða íðefninu og í jákvæða samanburðinum. Að því er varðar prófunaríðefni sem er ekki leysanlegt í dímetýlsúlfoxíði, heldur þynningarnar gerðar með vatni, verður að stilla gildi dímetýlsúlfoxíðs í öllum holum með lokastyrk prófunaríðefnisins í 1% eins og fyrir önnur prófunaríðefni og viðmiðunarefni.

Jákvæði samanburðurinn sem er notaður í greiningunni KeratinoSens™ er sinnamínaldehýð (CAS nr. 14371-10-9, ≥ 98% hreinleiki) en fyrir það er tilreidd röð 5 aðalstyrkleika á bilinu 0,4 til 6,4 mM í dímetýlsúlfoxíði (úr 6,4 mM stofnlausn) og þynnt eins og lýst er fyrir aðalstyrkleikana í 22. lið þannig að endanlegur styrkur jákvæða samanburðarins er á bilinu 4 til 64 µM. Hægt er að nota aðra heppilega jákvæða samanburði, sem helst gefa $EC_{1,5}$-gildi um miðbik bilsins, ef rannsóknarsöguleg gögn eru tiltæk til að leiða út samanburðarhæfar viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur.

Notkun prófunaríðefnisins og samanburðarefna

Að því er varðar hvert prófunaríðefni og efni fyrir jákvæðan samanburð þarf eina tilraun til að leiða út spá (jákvæða eða neikvæða) sem samanstendur af a.m.k. tveimur óháðum endurtekningum sem hver um sig inniheldur þrjú samskonar sýni (þ.e. n = 6). Ef um er að ræða ósamhljóma niðurstöður úr óháðu endurtekningunum tveimur skal gera þriðju endurtekninguna sem felur í sér þrjú samskonar sýni (þ.e. n = 9). Hver óháð endurtekning er gerð á mismunandi degi með nýrri stofnlausn prófunaríðefnis og frumum sem eru heimtar meðan þær eru ósamfelldar. Frumur mega þó vera úr sömu umsáningu.

Eftir sáningu, eins og lýst er í 20. lið, eru frumurnar látnar vaxa í 24 klst. í míkrótítrunarbökkum með 96 holum. Ætið er síðan fjarlægt og nýtt ræktunaræti sett í staðinn (150 µl ræktunaræti sem inniheldur sermi en án Geneticin ef um er að ræða KeratinoSens™), 50 µl af 25-falt þynnta prófunaríðefninu og viðmiðunarefnunum er bætt í það. Að minnsta kosti ein hola í hverjum bakka skal skilin eftir tóm (engar frumur og engin meðhöndlun) til að meta bakgrunnsgildi.

Meðhöndluðu bakkarnir eru síðan látnir standa í u.þ.b. 48 klst. við 37 ± 1 °C að viðbættu 5% CO_2 í greiningunni KeratinoSens™. Þess skal gætt að forðast uppgufun rokgjarnra prófunaríðefna og víxlmengun prófunaríðefna milli hola, t.d. með því að hylja bakkana með álpappír fyrir viðstöðuna með prófunaríðefnunum.

Mælingar á virkni lúsíferasa

Þrír þættir eru mikilvægir til að tryggja viðeigandi ljómunarmælingar:

— val á næmum ljósmæli,

— notkun á bakka sem er nægilega hár til að forðast víxlmengun með ljósi og

— notkun á lúsíferasahvarfefni sem gefur frá sér nægt ljós til að tryggja fullnægjandi næmi og lítinn breytileika.

Fyrir prófun skal framkvæma samanburðartilraunauppsetningu eins og lýst er í 3. viðbæti til að tryggja að þessir þrír þættir séu uppfylltir.

Eftir 48 klst. váhrifatíma með prófunaríðefninu og viðmiðunarefnum í greiningunni KeratinoSens™ eru frumurnar þvegnar með fosfatstilltri saltlausn og viðeigandi sundrunarjafnalausn til ljómunarmælingar sett í hverja holu í 20 mínútur við stofuhita.

Bakkar með lausninni af rofnum frumum eru síðan settir í ljósmælinn til mælingar en í greiningunni KeratinoSens™ er hann forritaður til að: i) bæta lúsíferasahvarfefninu í hverja holu (þ.e. 50 µl), ii) bíða í 1 sekúndu og iii) samþætta lúsíferasavirknina í 2 sekúndur. Ef annars konar stillingar eru notaðar, sem til dæmis ráðast af tegund ljósmælis sem er notuð, skal færa rök fyrir því. Enn fremur má einnig nota ljómunarhvarfefni (e. *glow substrate*) að því tilskildu að gæðaeftirlitstilraunin í 3. viðbæti sé uppfyllt á árangursríkan hátt.

Mat á frumueiturhrifum

Að því er varðar greininguna KeratinoSens™ á lífvænleika fruma er skipt um æti eftir 48 klst. váhrifatíma fyrir nýtt æti sem inniheldur MTT (3-(4,5-dímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-difenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blátt tetrasólíumbrómíð; CAS nr. 298-93-1) og frumurnar látnar standa í 4 klst. við 37 °C að viðbættu 5% CO_2. MTT-ætið er síðan fjarlægt og frumunum sundrað (t.d. með því að bæta 10% SDS-lausn í hverja holu) yfir nótt. Gleypnin er mæld með ljósmæli, þ.e. við 600 nm, eftir hristing.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á gögnum

Eftirfarandi breytur eru reiknaðar út í greiningunni KeratinoSens™:

— meðaltalsgildi hámarksmargfeldis vakningar lúsíferasavirkni (I_{max}) sem mælist fyrir hvern styrkleika prófaða íðefnisins og jákvæðs samanburðar,

— $EC_{1,5}$-gildi sem stendur fyrir þann styrk þar sem vakning lúsíferasavirkni liggur yfir 1,5-földum viðmiðunarmörkum (þ.e. 50% aukning lúsíferasavirkni) og

— IC_{50}- og IC_{30}-styrkgildi fyrir 50% og 30% minnkun á lífvænleika frumna.

— Margfeldi vakningar lúsíferasavirkni er reiknað út með jöfnu 1 og hámarksmargfeldi vakningar í heild sinni (I_{max}) er reiknað sem meðaltal hverrar endurtekningar fyrir sig.

Jafna 1:

$$\text{Margfeldi vakningar} = \frac{\left(\mathrm{L_{sýni}} - L_{\mathrm{blanksýni}}\right)}{\left(\mathrm{L_{leysir}} - \mathrm{L_{blanksýni}}\right)}$$

Þar sem

$L_{sýni}$ er ljómunarmælingin í holunni með sýninu með prófunaríðefninu

$L_{blanksýni}$ er ljómunarmælingin í holunni með blanksýninu sem inniheldur engar frumur og er ekki meðhöndlað

L_{leysir} er meðaltal ljómunarmælingar í holunum með sýnunum sem innihalda frumur og samanburð (neikvæður) með leysi

$EC_{1,5}$ er reiknað út með línulegum innreikningi samkvæmt jöfnu 2 og $EC_{1,5}$ í heild sinni er reiknað út sem faldmeðaltal hverrar endurtekningar fyrir sig.

Jafna 2:

$$\mathrm{EC1{,}5} = (\mathrm{C}_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - \mathrm{I}_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

Þar sem

C_a er lægsti styrkur í µM með > 1,5-faldri vakningu

C_b er hæsti styrkur í µM með > 1,5-faldri vakningu

I_a er margfeldi vakningar, mælt við lægsta styrk með > 1,5-faldri vakningu (meðaltal úr þremur holum með samskonar sýni)

I_b er margfeldi vakningar, mælt við hæsta styrk með < 1,5-faldri vakningu (meðaltal úr þremur holum með samskonar sýni)

Lífvænleiki er reiknaður út með jöfnu 3:

Jafna 3:

$$\text{Lífvænleiki} = \frac{\left(V_{\text{sýni}} - V_{\text{blanksýni}}\right)}{V_{\text{leysir}} - V_{\text{blanksýni}}} \times 100$$

þar sem

$V_{sýni}$ er mæling á MTT-gleypni í holunni með prófunaríðefninu

$V_{blanksýni}$ er mæling á MTT-gleypni í holunni með blanksýninu sem inniheldur engar frumur og er ekki meðhöndlað

V_{leysir} er meðaltal mælingar á MTT-gleypni í holunum sem innihalda frumur og samanburð (neikvæður) með leysi

IC_{50} og IC_{30} eru reiknuð út með línulegum innreikningi samkvæmt jöfnu 4 og EC_{50} og IC_{30} í heild sinni eru reiknuð út sem faldmeðaltal hverrar endurtekningar fyrir sig.

Jafna 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

þar sem

X er minnkun við styrkinn (í %)sem á að reikna út (50 og 30 fyrir IC_{50} og IC_{30})

C_a er lægsti styrkur í µM með > x % minnkun á lífvænleika

C_b er hæsti styrkur í µM með < x % minnkun á lífvænleika

V_a er lífvænleiki (í %) við lægsta styrkinn með > x % minnkun á lífvænleika

V_b er lífvænleiki (í %) við hæsta styrkinn með < x % minnkun á lífvænleika

Fyrir hvern styrk sem sýnir > 1,5-falda vakningu lúsíferasavirkni er reiknuð út tölfræðileg marktækni (t.d. með tveggja hala t-prófi (e. *two-tailed Student's t-test*)) þar sem ljómunargildi samskonar sýnanna þriggja eru borin saman við ljómunargildi úr samanburðarholum (neikvæðum) með leysi til að ákvarða hvort vakning lúsíferasavirkni er tölfræðilega marktæk ($p < 0{,}05$). Lægsti styrkur með > 1,5-faldri vakningu lúsíferasavirkni er gildið sem ákvarðar $EC_{1,5}$-gildið. Kannað er í hverju tilviki hvort þetta gildi sé lægra en IC_{30}-gildið, sem bendir til þess að minnkun á lífvænleika frumna sé minni en 30% við það $EC_{1,5}$-gildi sem ákvarðar styrkleikann.

Mælt er með því að kanna gögnin sjónrænt með aðstoð línurita. Ef ekki sést skýr skammtasvörunarferill eða ef skammtasvörunarferillinn sem fæst er tvífasa (þ.e. fer tvisvar yfir viðmiðunarmörkin 1,5) skal endurtaka tilraunina til að staðfesta hvort þetta eigi sérstaklega við um prófunaríðefnið eða stafi af gervingi í tilrauninni. Ef samanburðarnákvæmni er með tvífasa svörunina í óháðri tilraun skal skrá lægra $EC_{1,5}$-gildin (styrkinn þegar farið var yfir viðmiðunarmörkin 1,5 í fyrra skiptið).

Í örfáum tilvikum þar sem tölfræðilega ómarktæk vakning, sem er hærri en 1,5-föld, kemur í ljós og þar á eftir hærri styrkur með tölfræðilega marktækri vakningu teljast þessar niðurstöður því aðeins gildar og jákvæðar ef tölfræðilega marktæka vakningin, sem er hærri en viðmiðunarmörkin 1,5, fékkst við styrk sem er ekki frumueitrandi.

Að lokum, að því er varðar prófunaríðefni sem gefa 1,5-falda vakningu eða hærri strax við lægsta prófunarstyrkinn 0,98 μM, er fastsett $EC_{1,5}$-gildi sem nemur < 0,98, byggt á sjónrænni skoðun á skammtasvörunarferlinum.

Samþykktarviðmiðanir

Eftirfarandi samþykktarviðmiðanir skulu uppfylltar þegar greiningin KeratinoSens™ er notuð. Í fyrsta lagi skal sú vakning lúsíferasavirkni sem fæst með jákvæða samanburðinum, sinnamínaldehýði, vera tölfræðilega marktækt yfir viðmiðunarmörkunum 1,5 (t.d. með því að nota t-próf) í a.m.k. einum þeirra styrkleika sem er prófaður (frá 4 til 64 μM).

Í öðru lagi skal $EC_{1,5}$-gildið vera innan tveggja staðalfrávika frá rannsóknarsögulegu meðaltali prófunarstöðvarinnar (t.d. á bilinu 7 μM og 30 μM, byggt á fullgildingargagnabanka) sem skal uppfært reglulega. Að auki skal meðaltal vakningar í samskonar sýnunum þremur fyrir sinnamínaldehýð við 64 μM vera á bilinu 2 til 8. Ef síðari viðmiðunin er ekki uppfyllt skal kanna skammtasvörun sinnamínaldehýðs vandlega og einungis má taka prófanir gildar ef fram kemur skýr skammtasvörun með aukinni vakningu lúsíferasavirkni við aukinn styrk jákvæða samanburðarins.

Að lokum skal frávíksstuðull meðaltals fyrir ljómunarmælinguna fyrir neikvæða (leysir) samanburðinn með dímetýlsúlfoxíði vera undir 20% í hverri endurtekningu sem samanstendur af 6 holum sem eru prófaðar þrefalt. Ef breytileikinn er meiri skal ekki nota niðurstöðurnar.

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

Spá með KeratinoSens™ er talin jákvæð ef eftirfarandi fjögur skilyrði eru öll uppfyllt í tveimur af tveimur eða í sömu tveimur af þremur endurtekningum, að öðrum kosti telst spá með KeratinoSens™ vera neikvæð (mynd 1):

1. I_{max} er hærra en (>) 1,5-falt og tölfræðilega marktækt öðruvísi í samanburði við samanburð (neikvæðan) með leysi (eins og ákvarðað er með tveggja hala ópöruðu t-prófi),

2. lífvænleiki frumna er meiri en (>) 70% við lægsta styrk með vakningu lúsíferasavirkni sem er meira en 1,5-föld (þ.e. við það gildi $EC_{1,5}$ sem ákvarðar styrkleikann),

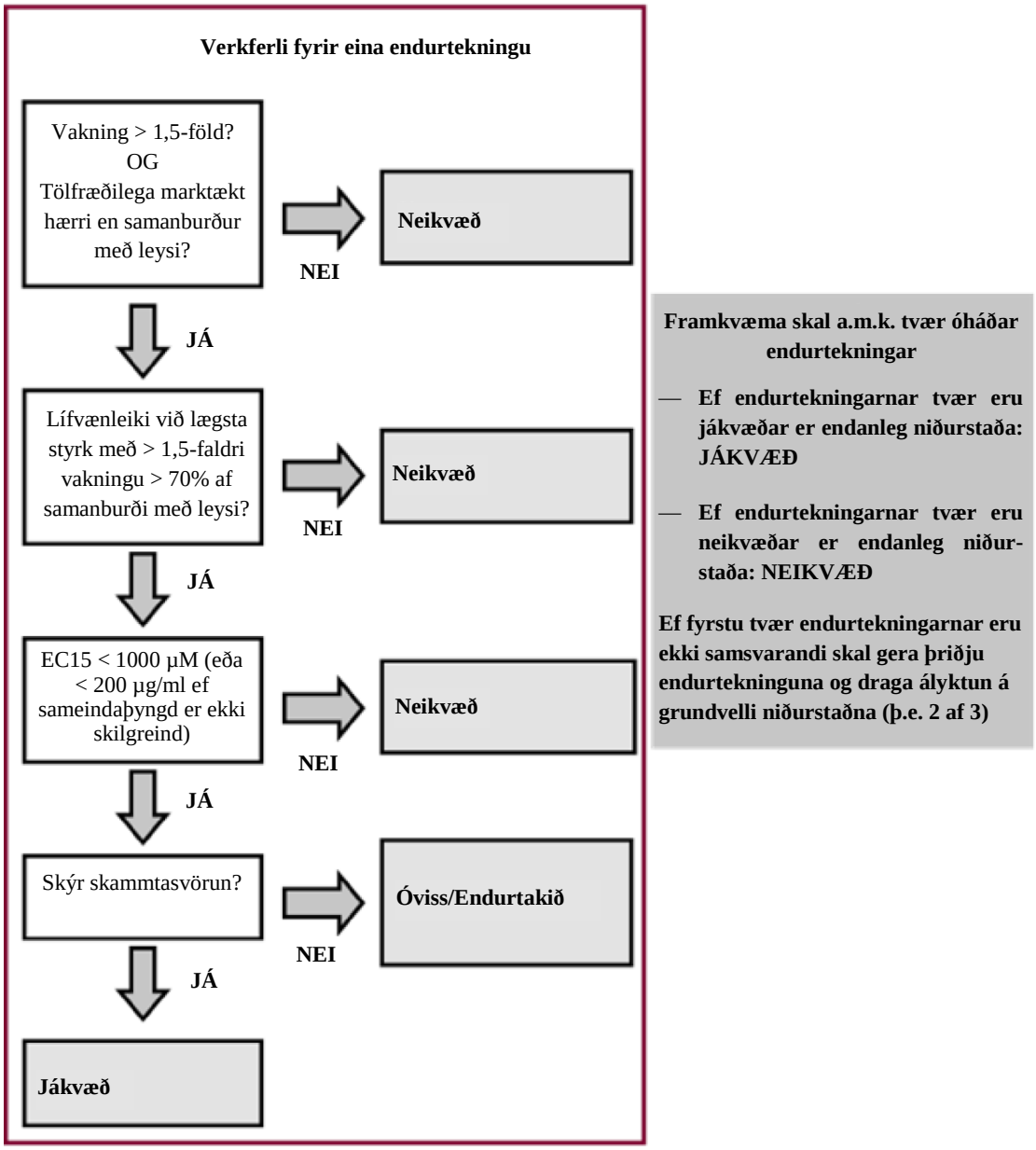
3. $EC_{1,5}$-gildi er undir (<) 1000 μM (eða < 200 μg/ml fyrir prófunaríðefni með óskilgreinda sameindaþyngd);

4. vakning lúsíferasa er greinilega skammtasvörun í heildina (eða tvífasa svörun eins og getið er um í lið 33).

Ef öll þrjú fyrstu skilyrðin eru uppfyllt í tiltekinni endurtekningu en vakning lúsíferasans er ekki skýr skammtasvörun skal líta á niðurstöðuna úr þeirri endurtekningu sem óvissa og e.t.v. þarf að gera frekari prófanir (mynd 1). Að auki skal einnig líta á neikvæða niðurstöðu, sem fæst með styrkleikunum < 1000 μM (eða < 200 μg/ml fyrir prófunaríðefni með óskilgreinda sameindaþyngd), sem óvissa (sjá 11. lið).

Mynd 1

Spálíkan sem er notað í greiningunni KeratinoSens™ Spá með KeratinoSens™ skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. og 11. liðar.



Í örfáum tilvikum geta prófunaríðefni, sem vekja lúsíferasavirkni mjög nálægt frumueitrandi gildum, verið jákvæð í sumum endurtekningum við gildi sem eru ekki frumueitrandi (þ.e. gildi $EC_{1,5}$ ákvarðar styrkleikann undir (<) IC_{30}) og í öðrum endurtekningum einungis við frumueitrandi gildi (þ.e. gildi $EC_{1,5}$ ákvarðar styrkleikann yfir (>) IC_{30}). Slík prófunaríðefni skulu endurprófuð með þrengri greiningu á tengslum skammts og svörunar með notkun á lægri þynningarstuðli (t.d. 1,33 eða √2 (= 1,41)-föld þynning milli hola) til að ákvarða hvort vakning hafi orðið við frumueitrandi gildi eða ekki (9. heimild).

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni

— Efni með einum efnisþætti

  — Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Útlit, vatnsleysni, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.

— Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

— Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blanda:

— Lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér á undan), hreinleika, magnbundu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli (sjá hér á undan), að því marki sem unnt er.

— Útlit, vatnsleysni, leysni í dímetýlsúlfoxíði og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er.

— Sameindaþyngd eða sýndarsameindarþyngd ef um er að ræða blöndur/fjölliður af þekktri samsetningu eða aðrar upplýsingar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar.

— Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

Samanburðir

— Jákvæður samanburður

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer, SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla og/eða aðrar auðkenningar.

— Útlit, vatnsleysni, leysni í dímetýlsúlfoxíði, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli, að því marki sem unnt er og þar sem við á.

— Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

— Meðhöndlun fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun).

— Styrkur eða styrkleikar sem eru prófaðir.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Tilvísanir í rannsóknarsögulegar niðurstöður fyrir jákvæðan samanburð sem sýna viðeigandi viðmiðanir fyrir ásættanlegar keyrslur, ef við á.

— Neikvæður (burðarefni) samanburður

— Efnafræðileg sanngreining s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-númer og/eða aðrar auðkenningar.

— Hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

— Útlit, sameindaþyngd og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli ef aðrir neikvæðir leysar/burðarefni eru notuð en þau sem getið er um í prófunaraðferðinni og að því marki sem unnt er.

— Skilyrði og stöðugleiki við geymslu, að því marki sem unnt er.

— Rökstuðningur fyrir vali á leysi fyrir hvert prófunaríðefni.

Skilyrði fyrir prófunaraðferðina

— heiti og heimilisfang bakhjarls, prófunarstöðvar og rannsóknarstjóra,

— Lýsing á prófunaraðferðinni sem er notuð.

— Frumulína sem er notuð, skilyrði við geymslu hennar og uppruni (t.d. frá hvaða starfsstöð hún var fengin).

— Umsáningartala og umfang samfellingar frumnanna sem eru notaðar í prófunina.

— Frumutalningaraðferð sem er notuð fyrir sáningu áður en prófað er og ráðstafanir sem gerðar eru til að tryggja einsleita dreifingu frumufjöldans (sjá 20. lið).

— Ljósmælir sem er notaður (t.d. tegund), þ.m.t. tækjastillingar, lúsíferasahvarfefni sem er notað og sýnt fram á viðeigandi ljómunarmælingar, byggt á samanburðarprófuninni sem lýst er í 3. viðbæti.

— Verklagið sem er notað til að sýna fram á hæfni rannsóknarstofunnar til að framkvæma prófunaraðferðina (t.d. með prófun á hæfnisefnum) eða til að sýna fram á samanburðarnákvæma framkvæmd prófunaraðferðarinnar yfir lengri tíma.

Prófunaraðferð

— Fjöldi endurtekninga og samskonar sýna sem eru notuð.

— Styrkur prófunaríðefna, íbætingaraðferð og váhrifatími sem eru notuð (ef frábrugðið því sem mælt er með).

— lýsing á þeim matsviðmiðunum og viðmiðunum fyrir ákvarðanir sem eru notaðar,

— lýsing á viðmiðunum fyrir samþykkt rannsóknar sem eru notaðar,

— lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni.

Niðurstöður

— Töflusetning á I_{max}, $EC_{1,5}$ og gildum fyrir lífvænleika (þ.e. IC_{50}, IC_{30}), sem fást fyrir prófunaríðefnið og fyrir jákvæðan samanburð fyrir hverja endurtekningu fyrir sig, sem og meðalgildi (I_{max}: meðalgildi; $EC_{1,5}$ og gildi fyrir lífvænleika: faldmeðaltal) og staðalfrávik sem er reiknað út með því að nota gögn úr hverri endurtekningu fyrir sig og upplýsingar um flokkun prófunaríðefnis samkvæmt spálíkaninu.

— Frávíksstuðull sem fæst úr ljómunarmælingum á neikvæða samanburðinum fyrir hverja tilraun.

— Línurit sem sýnir skammtasvörunarferla fyrir vakningu lúsíferasavirkni og lífvænleika.

— Lýsing á öðrum athugunum sem skipta máli, ef við á.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

— Umfjöllun um niðurstöðurnar sem fást með greiningunni KeratinoSens™.

— Athugun á niðurstöðum prófunaraðferðarinnar með skírskotun til samþættrar aðferðar við prófun og mat ef aðrar upplýsingar sem skipta máli eru tiltækar.

Ályktun

HEIMILDIR:

1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Aðgengilegt á: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

4) Kafli B.42 í þessum viðauka: Húðnæming: Eitlagreining.

5) Kafli B.6 í þessum viðauka: Húðnæming.

6) Kafli B.50 í þessum viðauka: Húðnæming: DA-Eitlagreining.

7) Kafli B.51 í þessum viðauka: Húðnæming: BrdU-ELISA-Eitlagreining.

8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Aðgengilegt á: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Aðgengilegt á: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/ international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð (29. heimild).

Ferli neikvæðra afleiðinga (AOP) Röð atburða, frá efnafræðilegri byggingu markíðefnis, eða hóps svipaðra íðefna, um sameindaræsingu að niðurstöðu, sem miðað er við, í lífi (2. heimild).

ARE: Svörunarset andoxunarefna (einnig kallað svörunarset rafsækinna efna (EpRE)) er svörunarset sem finnst ofanvert við stýrisvæði margra frumuverndandi (e. *cytoprotective*) gena og II. fasa gena. Þegar það er virkjað með Nfr2 stýrir það umritunarörvun þessara gena.

Íðefni: Efni eða blanda.

Fráviksstuðull: Mæling á breytileika sem er reiknaður út fyrir hóp gagna úr samskonar sýnum með því að deila í staðalfrávikið með meðaltalinu. Hægt er að margfalda hann með 100 til að gefa hann upp sem hundraðshluta.

$EC_{1,5}$: Innreiknaður styrkur fyrir 1,5-falda lúsíferasavakningu.

IC_{30}: Styrkur sem hefur í för með sér 30% minnkun á lífvænleika frumna.

IC_{50}: Styrkur sem hefur í för með sér 50 % minnkun á lífvænleika frumna.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur verður fyrir váhrifum frá því efni.

Samþætt aðferð við prófun og mat (IATA): Skipulögð aðferð sem er notuð til hættugreiningar (hugsanlegrar), hættulýsingar (máttur) og/eða öryggismats (hugsanleg(ur)/máttur og váhrif) á íðefnum eða hópi íðefna, sem samþættar og vegur skipulega öll gögn sem skipta máli til grundvallar eftirlitsákvörðunum sem varða hugsanlega hættu og/eða áhættu og/eða þörf á nákvæmari og þar af leiðandi færri prófunum

I_{max}: Hámarksvakningarstuðull fyrir vakningu lúsíferasavirkni í samanburði við samanburð (neikvæðan) með leysi sem er mældur við hvaða styrk prófunaríðefnis sem er.

Keap1: Kelch-líkt ECH-tengt prótín 1 er skynjaraprótín sem getur stýrt virkni Nrf2. Við óörvuð skilyrði beinist skynjaraprótínið Keap1 að umritunarþættinum Nrf2 fyrir ubiqutin-tengingu og prótínsundrandi niðurbrot í próteasómum. Samgild breyting á hvarfgjörnum systeínleifum Keap1 af völdum lítilla sameinda getur leitt til þess að Nrf2 klofnar frá Keap1 (8. 10. og 11. heimild).

Blanda: Tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í (1. heimild).

Efni með einum efnisþætti: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi að a.m.k. 80% (massahlutfall).

Fjölþáttaefni: Efni, skilgreint af magnbundinni samsetningu, þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur ≥ 10% (massahlutfall) og < 80 % (massahlutfall). Fjölþáttaefni er afleiðing af framleiðsluferli. Mismunurinn á blöndu og fjölþáttaefni er sá að blandan fæst með blöndun tveggja eða fleiri efna án efnahvarfs. Fjölþáttaefni er afleiðing af efnahvarfi.

Nrf2: Kjarnaþáttur *(erythroid-derived 2)-like 2*, er umritunarþáttur sem á þátt í andoxunarsvörunarferlinu. Þegar Nrf2 er ekki ubiquitin-tengt safnast það upp í umfryminu og tilfærist yfir í kjarnann þar sem það samþættist ARE ofanvert við stýrisvæði margra frumuverndandi gena og kveikir umritun þeirra (8., 10. og 11. heimild).

Jákvæður samanburður: Samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með efni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera of kröftug.

Gildi: Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (29. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni (29. heimild).

Samanburðarnákvæmni: Samkvæmni í niðurstöðum sem fást með prófunum á sama íðefninu með því að nota sömu aðferðarlýsingu prófunar (sjá áreiðanleika) (29. heimild).

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (29. heimild).

Samanburður með leysi eða burðarefni: Samskonar sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis nema prófunaríðefnið en með leysinum sem er notaður. Hún er notuð til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunaríðefni sem er leyst upp í sama leysi.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófunaraðferðinni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (29. heimild).

Efni: Frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar og óhreinindi sem verða til í vinnslunni en þó ekki leysiefni sem hægt er að skilja frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess (1. heimild).

Prófunaríðefni: Íðorðið „prófunaríðefni“: er notað um það sem verið er að prófa.

Hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK SÞ): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendur, starfsmenn, flytjendur, neytendur og bráðaliðar) og umhverfinu (1. heimild).

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

Fullgild prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem telst hafa fullnægjandi gildi og áreiðanleika í tilteknum tilgangi og sem byggist á vísindalega traustum meginreglum. Prófunaraðferð er aldrei fullkomlega algild, einungis í tengslum við skilgreindan tilgang (29. heimild).

———

2. viðbætir

HÆFNISEFNI

***Húðnæming í glasi:* Prófunaraðferð með ARE-Nrf2-lúsíferasa**

Áður en aðferðin, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er tekin til reglubundinnar notkunar skulu rannsóknarstofur sýna fram á tæknilega hæfni sína með því að fá rétta þá spá sem búist er við með KeratinoSens™ fyrir hæfnisefnin 10, sem mælt er með í töflu 1, og með því að fá fram $EC_{1,5}$- og IC_{50}-gildi sem falla innan viðkomandi viðmiðunarbils fyrir a.m.k. 8 af hverjum 10 hæfnisefnum. Þessi hæfnisefni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið húðnæmingarhættu. Aðrar valviðmiðanir voru fáanleiki á almennum markaði og að hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í glasi væru fáanleg úr greiningunni KeratinoSens™.

Tafla 1

Efni sem eru ráðlögð til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir greininguna KeratinoSens™

Hæfnisefni	CAS-númer	Eðlisástand	Spá *í lífi* ([1])	Spá með KeratinoSens™ ([2])	$EC_{1,5}$ (µM) viðmiðunarbil ([3])	IC_{50} (µM) viðmiðunarbil ([3])
Ísóprópanól	67-63-0	Vökvi	Ekki næmir	Neikvæð	> 1 000	> 1 000
Salisýlsýra	69-72-7	Fast efni	Ekki næmir	Neikvæð	> 1 000	> 1 000
Mjólkursýra	50-21-5	Vökvi	Ekki næmir	Neikvæð	> 1 000	> 1 000
Glýseról	56-81-5	Vökvi	Ekki næmir	Neikvæð	> 1 000	> 1 000
Sinnamýlalkóhól	104-54-1	Fast efni	Næmir (vægur)	Jákvæð	25–175	> 1 000
Etýlenglýkóldí-metýlakrýlat	97-90-5	Vökvi	Næmir (vægur)	Jákvæð	5–125	> 500
2-merkaptóbensóþíasól	149-30-4	Fast efni	Næmir (meðalsterkur)	Jákvæð	25–250	> 500
Metýldíbrómglútarónítríl	35691-65-7	Fast efni	Næmir (sterkur)	Jákvæð	< 20	20–100
4-metýlamínófenónsúlfat	55-55-0	Fast efni	Næmir (sterkur)	Jákvæð	< 12,5	20–200
2,4-dínítróklóróbensen	97-00-7	Fast efni	Næmir (mjög sterkur)	Jákvæð	< 12,5	5–20

([1]) Spár um hættu *í lífi* og (mátt) byggjast á eitlagreiningargögnum (13. heimild). Máttur *í lífi* er fenginn með því að nota viðmiðanirnar sem lagðar eru til hjá Evrópumiðstöð rannsókna á umhverfiseiturhrifum og eiturefnafræði (ECETOC) (24. heimild).

([2]) Spá með KeratinoSens™ skal skoðuð innan ramma samþættrar aðferðar við prófun og mat og í samræmi við ákvæði 9. og 11. liðar í þessari prófunaraðferð.

([3]) Byggt á sögulegum mældum gildum (12. heimild).

3. viðbætir

GÆÐAEFTIRLIT MEÐ LJÓMUNARMÆLINGUM

Grunntilraun til að tryggja bestu ljómunarmælingarnar í greiningunni KeratinoSens™

Eftirfarandi þrjár breytur eru mikilvægar til að tryggja að áreiðanlegar niðurstöður fáist með ljósmælinum:

— nægilegt næmi sem gefur stöðugan bakgrunn í samanburðarholum,

— enginn stigull eftir bakkanum vegna langs aflestrartíma og

— engin ljósmengun í aðliggjandi holum frá mjög virkum holum.

Fyrir prófun er mælt með því að tryggja að ljómunarmælingar eigi við með því að prófa samanburðarbakka sem er settur upp eins og lýst er hér á eftir (þrjár samskonar greiningar).

Uppsetning bakka fyrir fyrstu þjálfunartilraun

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Eyða**

EGDMA = etýlenglýkóldímetílakrýlat (CAS nr.: 97-90-5) íðefni sem veldur mikilli vakningu

CA = sinnamínaldehýð, jákvætt viðmiðunarefni (CAS nr.: 104-55-2)

Gæðaeftirlitsgreiningin skal sýna fram á eftirfarandi:

— greinileg skammtasvörun í línu D með I_{max} > 20-falt yfir bakgrunninum (í flestum tilvikum nást gildi fyrir I_{max} á bilinu 100 og 300),

— engin skammtasvörun í línu C og E (engin vakningargildi yfir 1,5 (helst ekki yfir 1,3)) vegna hugsanlegrar ljósmengunar, einkum við hliðina á mjög virkum holum í EGDMA-línunni,

— enginn tölfræðilega marktækur munur milli lína A, B, C, E, F og G (þ.e. enginn stigull eftir bakkanum) og

— breytileiki í öllum línunum A, B, C, E, F og G og í DMSO-holunum í línu H skal vera undir 20% (þ.e. stöðugur bakgrunnur).

———

B.61 **Prófunaraðferð með flúrskinslausnarleka til greiningar á efnum sem eru ætandi og mjög ertandi fyrir augu**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 460 um prófanir (2012). Prófunaraðferð með flúrskinslausnarleka (FL-prófunaraðferð) er aðferð til prófunar í glasi sem hægt er að nota, við tilteknar aðstæður og með tilteknum takmörkunum, til að flokka íðefni (efni og blöndur) sem efni sem eru ætandi og mjög ertandi fyrir augu, eins og skilgreint er í hnattsamræmdu kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar á íðefnum (HSK) (1. undirflokkur), reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna ([1]) (1. undirflokkur) og í skilningi Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna (EPA) (1. undirflokkur) (1. og 2. heimild). Í þessari prófunaraðferð eru mjög augnertandi efni skilgreind sem íðefni sem valda vefjaskemmdum í auga, eftir að prófunaríðefnið er borið á, sem ganga ekki til baka innan 21 dags eða valda alvarlegri sjónskerðingu og augnætandi efni eru íðefni sem valda vefjaskemmdum í auga sem ganga ekki til baka. Þessi íðefni flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ, 1. undirflokk í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 eða I. undirflokk EPA.

Þótt FL-prófunaraðferðin sé ekki talin gild sem heildarvalkostur í stað augnprófunar í lífi á kanínum er hún ráðlögð sem hluti af stigskiptri prófunaráætlun vegna lögbundinnar flokkunar og merkingar. Því er FL-prófunaraðferðin ráðlögð sem upphafsstig innan ofansækinnar nálgunar til að greina efni sem eru augnætandi eða mjög augnertandi, einkum fyrir takmarkaðar gerðir íðefna (þ.e. vatnsleysanleg efni og blöndur) (3. og 4. heimild).

Nú er almennt viðurkennt að í fyrirsjáanlegri framtíð geti engin augnertingarprófun í glasi komið í stað augnprófunarinnar í lífi (prófunaraðferð B.5 (5. heimild)) til að spá fyrir um allar tegundir ertinga fyrir mismunandi íðefnaflokka. Stefnumiðaðar samsetningar nokkurra staðgönguprófunaraðferða innan (stigskiptrar) prófunaráætlunar gætu þó komið í stað augnprófunarinnar í lífi (4. heimild). Ofansækin nálgun (4. heimild) er hönnuð til að nota þegar búist er við, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að íðefni hafi mikinn ertingarmátt.

Á grundvelli spálíkansins sem lýst er í 35. lið er hægt að nota FL-prófunaraðferðina til að greina íðefni innan takmarkaðs notkunarsviðs sem augnætandi eða mjög augnertandi (1. undirflokkur HSK SÞ, 1. undirflokkur í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, I. undirflokkur EPA) án frekari prófana. Gert er ráð fyrir því sama fyrir blöndur þó að þær hafi ekki verið notaðar við fullgildinguna. Því er hægt að nota FL-prófunaraðferðina til að ákvarða augnertingar- eða augnætingareiginleika íðefna í samræmi við raðprófunaráætlunina í prófunaraðferð B.5 (5. heimild). Íðefni sem ekki er spáð að sé augnætandi eða mjög augnertandi með FL-prófunaraðferðinni myndi þó þurfa að prófa með einni eða fleiri prófunaraðferðum til viðbótar (í glasi og/eða í lífi) sem geta greint nákvæmlega i. íðefni sem gefa falsneikvæðar niðurstöður í glasi fyrir augnætingu/mjög augnertandi efni með FL-prófunaraðferðinni (1. undirflokkur HSK SÞ, 1. undirflokkur í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, I. undirflokkur EPA), ii. íðefni sem flokkast ekki sem augnætandi/-ertandi (utan flokks í HSK SÞ, utan flokks í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, IV. undirflokkur EPA), og/eða iii. íðefni sem eru í meðallagi eða vægt ertandi (undirflokkar 2A og 2B í HSK SÞ, 2. undirflokkur í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, II. og III. undirflokk EPA).

Tilgangurinn með þessari prófunaraðferð er að lýsa aðferðunum sem eru notaðar til að meta mátt prófunaríðefnisins til að hafa ætandi eða mjög ertandi áhrifa á augu með mælingu á getu þess til að kalla fram skemmdir á ógegndræpu, samfelldu einlagi þekjufrumna. Helsta hlutverk þekju, eins og þeirrar sem er í slímhimnu og glæru, er óskert gegndræpi vegna flutnings um hana. Gegndræpi vegna flutnings um þekju er stjórnað með mismunandi þéttttengjum (e. *tight junctions*). Sýnt hefur verið fram á að aukið gegndræpi gegnum glæruþekjuna í lífi hefur samsvörun við umfang bólgna og yfirborðsskemmda sem koma fram er augnerting þróast.

Í FL-prófunaraðferðinni eru eiturhrif eftir váhrif af prófunaríðefninu í stuttan tíma mæld með aukningu á gegndræpi natríumflúrskinslitar um einlag þekjufrumna af gerðinni Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) sem eru ræktaðar í gegndræpum innskotsbollum (e. *permeable inserts*). Magn flúrskinslausnarlekans sem á sér stað er í hlutfalli við skemmdirnar af völdum íðefna á þéttengjunum, frumutengjunum og frumuhimnunum og hægt er að nota það til að meta möguleikann á eiturhrifum prófunaríðefnis á augu. Í 1. viðbæti er skýringarmynd af frumum af gerðinni MDCK sem eru ræktaðar á himnu í innskotsbolla fyrir FL-prófunaraðferðina.

([1]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1272/2008 frá 16. desember 2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna, um breytingu og niðurfellingu á tilskipunum 67/548/EBE og 1999/45/EB og um breytingu á reglugerð (EB) nr. 1907/2006 (Stjtíð. ESB L 353, 31.12.2008, bls. 1).

Skilgreiningar eru gefnar í 2. viðbæti.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

Þessi prófunaraðferð er byggð á 71. aðferðarlýsingu INVITTOX (6. heimild) sem Evrópumiðstöðin um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) mat í alþjóðlegri fullgildingarrannsókn í samstarfi við bandaríska samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) og miðstöð Japans fyrir fullgildingu staðgönguaðferða (JaCVAM).

Ekki er mælt með FL-prófunaraðferðinni til greiningar á íðefnum sem skal flokka sem vægt eða í meðallagi ertandi efni eða á íðefnum sem skal ekki að flokka sem augnertandi (efni og blöndur) (þ.e. undirfl. 2A eða 2B í HSK, utan flokka; 2. undirfl. í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, utan flokka; US EPA II., III. eða IV. fl.) eins og sýnt er fram á í fullgildingarrannsókninni (3. og 7. heimild).

Prófunaraðferðin á aðeins við fyrir vatnsleysanleg íðefni (efni og blöndur). Ef íðefnin eru vatnsleysanleg og/eða ef eiturhrifin minnka ekki við þynningu er almennt hægt að spá nákvæmlega fyrir um mátt þeirra til mikillar augnertingar með FL-prófunaraðferðinni (7. heimild). Til að íðefni flokkist sem vatnsleysanlegt skal það, við tilraunaskilyrði, vera uppleysanlegt í dauðhreinsaðri jafnaðri saltlausn samkvæmt Hank (HBSS) sem inniheldur kalsíum (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM), án fenólrauðs litvísis, við styrk sem er ≥ 250 mg/ml (einum skammti yfir þröskuldsgildinu 100 mg/ml). Ef prófunaríðefnið er uppleysanlegt undir styrknum 100 mg/ml en framkallar flúrskinslausnarleka strax við 20% af þeim styrk (þ.e. FL_{20} < 100 mg/ml) getur það þó flokkast í 1. undirflokk HSK eða I. undirflokk EPA.

Tilgreindu takmarkanirnar fyrir þessa prófunaraðferð útiloka sterkar sýrur og basa, festiefni fyrir frumur (e. *cell fixatives*) og mjög rokgjörn íðefni frá notkunarsviðinu. Þau íðefni hafa gangvirki sem eru ekki mælanleg með FL-prófunaraðferðinni, t.d. mikla storknun, sápumyndun eða sértæka hvarfgjarna efnafræðilega eiginleika. Aðrar tilgreindar takmarkanir fyrir þessa aðferð byggjast á niðurstöðunum um forspárgildi fyrir lituð og seigfljótandi prófunaríðefni (7. heimild). Erfitt er að fjarlægja báðar gerðir íðefna úr einlaginu eftir stutt váhrifatímabil og lagt er til að bæta megi forspárgetu prófunaraðferðarinnar með því að auka fjölda þeirra þrepa sem notuð eru til skolunar. Föst íðefni sem eru leyst upp í vökva hafa tilhneigingu til að falla út og erfitt getur verið að ákvarða lokastyrkinn til frumnanna. Ef íðefni í þeim efnafræðilegu og eðlisfræðilegu flokkum eru ekki höfð í gagnasafninu bætir það umtalsvert áreiðanleika FL-prófunaraðferðarinnar í öllum flokkunarkerfum ESB (Evrópusambandsins), EPA (Umhverfisverndarstofnunar Bandaríkjanna) og HSK (hnattsamræmda kerfisins (e. GHS)) (7. heimild).

Miðað við tilgang þessarar prófunaraðferðar (þ.e. að greina aðeins efni sem eru augnætandi eða mjög augnertandi) er hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna (sjá 13. lið) ekki mikilvægt þar eð slík íðefni myndu því næst verða prófuð með öðrum fullgiltum prófunum í glasi eða á kanínum, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, þar sem notuð er raðprófunaráætlun í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga (5. heimild) (sjá einnig 3. og 4. lið).

Aðrar tilgreindar takmarkanir FL-prófunaraðferðarinnar byggja á hlutfalli falsneikvæðra og falsjákvæðra niðurstaðna. Ef FL-prófunaraðferðin er notuð sem upphafsstig innan ofansækinnar nálgunar til að greina vatnsleysanleg efni og blöndur sem eru augnætandi/mjög augnertandi (1. undirflokkur HSK SÞ, 1. undirflokkur í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, I. undirflokkur EPA), er hlutfall falsjákvæðra niðurstaðna á bilinu 7% (7/103, HSK SÞ og reglugerð (EB) nr. 1272/2008) til 9% (9/99, EPA) og hlutfall falsneikvæðra niðurstaðna á bilinu 54% (15/28, EPA) til 56% (27/48, HSK SÞ og reglugerð (EB) nr. 1272/2008) þegar aðferðin er borin saman við niðurstöður úr prófunum í lífi. Íðefnaflokkar sem sýna falsjákvæðar og/eða falsneikvæðar niðurstöður í FL-prófunaraðferðinni eru ekki skilgreindir hér.

Tilteknar tæknilegar takmarkanir eiga sérstaklega við um MDCK-frumurækt. Þétttengin sem loka á flæði natríumflúrskinslitar í gegnum einlagið verða fyrir meiri skemmdum eftir því sem umsáningartala frumnanna hækkar. Ófullnægjandi myndun þétttengja leiðir til aukins flúrskinslausnarleka í ómeðhöndluðum samanburði. Því er mikilvægt að skilgreina leyfilegan hámarksleka í ómeðhöndlaða samanburðarsýninu (sjá 38. lið: 0% leki). Eins og í öllum greiningum í glasi þá er möguleiki á því að frumurnar breytist með tímanum og því er afar mikilvægt að tilgreina umsáningartölubilin fyrir greiningarnar.

Í sumum tilvikum er hægt að stækka núverandi notkunarsvið en aðeins að lokinni greiningu víðtækra gagnasafna fyrir prófunaríðefni sem hafa verið rannsökuð og helst fengin með prófunum (3. heimild). Þessi prófunaraðferð verður uppfærð til samræmis við það er nýjar upplýsingar og gögn eru tekin til athugunar.

Sérhver rannsóknarstofa, sem gerir þessa greiningu í fyrsta sinn, skal nota hæfnisíðefnin sem kveðið er á um í 3. viðbæti. Rannsóknarstofum er heimilt að nota þessi efni til að sýna fram á tæknilega færni sína við beitingu FL-prófunaraðferðarinnar áður en hún leggur inn gögn, fengin með FL-greiningu, vegna lögbundinnar flokkunar í hættuflokka.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

FL-prófunaraðferðin er greining í glasi sem byggist á frumueiturhrifum og frumustarfsemi og er gerð á samfelldu einlagi rörlaga þekjufrumna af gerðinni MDCK CB997 sem eru ræktaðar í hálfgegndræpum innskotsbollum og er líkan fyrir glæruþekjufrumur í lífi sem eru ekki í fjölgunarferli. MDCK-frumulínan er vel þekkt og myndar þétttengi og frumutengi svipuð og þau sem finnast á topplægri hlið táru- og glæruþekju. Þétttengi og frumutengi í lífi koma í veg fyrir að uppleyst efni og aðskotaefni fari í gegnum glæruþekjuna. Minnkað gegndræpi við flutning um þekju vegna skemmda á þétttengjum og frumutengjum er eitt af því fyrsta sem gerist við augnertingu af völdum íðefna.

Prófunaríðefnið er sett á samfellt frumulagið sem ræktað er á topphlið innskotsbollans. Að jafnaði er notast við stutt váhrif í 1 mínútu til að endurspegla eðlilegar aðstæður er varða váhrif á menn. Kosturinn við stutt váhrifatímabil er sá að efni og blöndur sem eru að stofni til úr vatni er hægt að prófa óblönduð ef auðvelt er að fjarlægja þau eftir váhrifatímabilið. Þetta gerir kleift að gera afdráttarlausari samanburð á niðurstöðunum og efnafræðilegum áhrifum í mönnum. Prófunaríðefnið er síðan fjarlægt og óeitruðum, mjög flúrljómandi natríumflúrskinslit er bætt við topphluta einlagsins í 30 mínútur. Skemmdir af völdum prófunaríðefnisins á þétttengjum eru ákvarðaðar út frá því magni flúrskinslausnar sem lekur í gegnum frumulagið innan tiltekins tímabils.

Magn natríumflúrskinslitar sem fer í gegnum einlagið og himnuna í innskotsbollanum í ákveðnu rúmmáli lausnar sem er í holunni (sem natríumflúrskinsliturinn lekur í) er ákvarðað með því að mæla styrkleika flúrskinslausnarinnar í holunni með flúrskinslitrófsmælingu. Magn flúrskinslausnarleka (FL) er reiknað út frá mælingum á styrk flúrskinslausnar (FI) úr tvenns konar samanburði: samanburðarblanki og samanburði með hámarksleka. Hundraðshluti leka og þar með umfang skemmda á þétttengingum er gefið upp, miðað við þessa samanburði, fyrir hvern ákveðinn styrkleika prófunaríðefnisins. Þá er reiknað út FL_{20} (þ.e. styrkleikinn sem veldur 20% flúrskinslausnarleka (FL) miðað við gildið sem skráð er fyrir ómeðhöndlaða samfellda einlagið og innskotsbolla án frumna). FL_{20} -gildið (mg/ml) er notað í spálíkaninu til að greina augnætingu og mjög ertandi efni (sjá 35. lið).

Endurheimt er mikilvægur þáttur í eiturhrifalýsingu prófunaríðefnis sem er einnig metin í augnertingarprófuninni í lífi. Bráðabirgðagreiningar gáfu vísbendingar um að gögn um endurheimt (allt að 72 klst. eftir váhrif frá íðefninu) gætu hugsanlega aukið forspárgildi 71. aðferðarlýsingar INVITTOX en frekara mats er þörf og það myndi batna með viðbótargögnum sem helst eru fengin með frekari prófunum (6. heimild). Þessi prófunaraðferð verður uppfærð til samræmis við það er nýjar upplýsingar og gögn eru tekin til athugunar.

VERKFERLI

Tilreiðsla einlagsins af frumum

Einlagið úr frumum af gerðinni MDCK CB997 er tilreitt með hálfsamrunnum frumum sem vaxa í frumuræktunarflösku í DMEM/F-12 næringarefnablöndu (1x styrkur með L-glútamíni, 15 mM HEPES, kalsíumi (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM) og 10% FCS/FBS óvirkjuð með hitun). Mikilvægt er að allir miðlar/lausnir sem notuð eru í FL-greiningunni innihaldi kalsíum í styrk á bilinu 1,8 mM (200 mg/l) og 1,0 mM (111 mg/l) til að tryggja myndun og heilleika þétttengja. Hafa skal eftirlit með umsáningartölubili frumna til að tryggja að þétttengi myndist með jöfnum og samanburðarnákvæmum hætti. Afþíddar frumurnar skulu helst vera innan umsáningartölubilsins 3–30 þar sem frumur innan þessa bils hafa svipaða virkni og það auðveldar samanburðarnákvæmni niðurstaðna greiningarinnar.

Áður en FL-prófunaraðferðin er framkvæmd eru frumurnar losaðar úr flöskunni með trypsíni, skildar í skilvindu og þá er hæfilegu magni af frumum sáð í innskotsbollana sem eru á bakka með 24 holum (sjá 1. viðbæti). Nota skal innskotsbolla sem eru 12 mm að þvermáli með himnu úr blönduðum sellulósaesterum, 80–150 µm þykkt og opstærð 0,45 µm, til sáningar á frumum. Í fullgildingarrannsókninni voru notaðir innskotsbollar af gerðinni Millicell-HA 12 mm. Eiginleikar innskotsbollans og gerð himnunnar eru mikilvæg þar sem þau geta haft áhrif á frumuvöxt og efnabindingargetu. Tilteknar gerðir íðefna gætu bundist himnunni í Millicell-HA-innskotsbollanum sem gæti haft áhrif á túlkun niðurstaðna. Hæfnisíðefni (sjá 3. viðbæti) skal nota til að sýna fram á jafngildi ef aðrar himnur eru notaðar.

Efnabindingargeta við himnuna í innskotsbollanum er algengari hjá plúshlöðnum íðefnum, s.s. bensalkóníumklóríði, sem dragast að hlaðinni himnu (7. heimild). Geta efnis til að bindast himnunni í innskotsbollanum getur aukið váhrifatímabil íðefnisins, sem leiðir til ofmats á möguleikanum á eiturhrifum af völdum íðefnisins, en getur einnig dregið efnislega úr leka flúrskinslausnarinnar í gegnum innskotsbollann með bindingu litarins við plúshlaðna íðefnið, sem hefur bundist himnunni í innskotsbollanum, sem leiðir til vanmats á möguleikanum á eiturhrifum af völdum íðefnisins. Auðvelt er að vakta þetta með því að láta himnuna eina og sér komast í snertingu við prófunaríðefnið í hæsta styrk og því næst bæta natríumflúrskinslit við venjulega styrkinn í staðlaðan tíma (enginn frumusamanburður). Ef natríumflúrskinsliturinn binst henni verður himnan í innskotsbollanum gulleit eftir að prófunarefnið hefur verið þvegið í burtu. Það er því nauðsynlegt að þekkja bindingareiginleika prófunaríðefnisins til að geta túlkað áhrif íðefnisins á frumurnar.

Frumur sem hefur verið sáð á innskotsbolla skulu mynda samfellt einlag þegar þær komast í snertingu við íðefni. Bæta skal við $1{,}6 \times 10^5$ af frumum í hvern innskotsbolla (400 µl af frumusviflausn með þéttleika upp á 4×10^5 frumur/ml). Við þessar aðstæður fæst venjulega samfellt einlag eftir 96 klst. í ræktun. Innskotsbolla skal skoða sjónrænt fyrir sáningu til að tryggja að allar skemmdir, sem skráðar eru við sjónrænt eftirlit eins og lýst er í 30. lið, stafi af meðhöndlun.

MDCK-frumuræktina skal geyma í hitakössum í rakabættu andrúmslofti við 5% ± 1% CO_2 og 37 ± 1 °C. Frumurnar skulu vera lausar við smit af völdum baktería, veira, berfryminga og sveppa.

Prófunar- og samanburðarefni sett á

Tilreiða skal nýja stofnlausn prófunaríðefnis fyrir hverja prófunarkeyrslu og skal hún notuð innan 30 mínútna frá tilreiðslu. Tilreiða skal prófunaríðefnin í HBSS-lausn sem inniheldur kalsíum (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM), án fenólrauðs litvísis til að forðast bindingu prótíns í sermi. Meta skal leysni íðefnisins í 250 mg/ml í HBSS-lausn fyrir prófun. Ef íðefnið myndar stöðuga sviflausn eða ýrulausn við þennan styrk (þ.e. heldur einsleitni og botnfellur eða skilur sig ekki í fleiri en einn fasa) í meira en 30 mínútur er enn hægt að nota HBSS-lausn sem leysi. Ef íðefni reynist óleysanlegt í HBSS-lausn í þessum styrk skal þó íhuga að nota aðrar prófunaraðferðir í stað FL-prófunaraðferðarinnar. Gæta skal varúðar við að nota létta jarðolíu sem leysi í þeim tilvikum þar sem íðefnið reynist vera óleysanlegt í HBSS-lausn þar sem ekki eru fyrirliggjandi nægileg gögn til að komast að niðurstöðu varðandi FL-greininguna við slík skilyrði.

Öll íðefni sem skal prófa eru tilreidd í dauðhreinsaðri HBSS-lausn úr stofnlausninni, sem inniheldur kalsíum (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM), án fenólrauðs litvísis, í fimm föstum styrkleikum, þynnt eftir massa miðað við rúmmál: 1, 25, 100, 250 mg/ml og óblönduð eða dauðhreinsuð lausn. Þegar fast efni er prófað skal mikill styrkur, 750 mg/ml, hafður með. Þennan styrk íðefnis gæti þurft að setja á frumurnar með ruðningspípettu. Ef eiturhrifin reynast vera á bilinu 25 og 100 mg/ml skal prófa eftirfarandi viðbótarstyrki tvisvar: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml FL_{20}-gildið skal fengið með þessum styrkjum að því tilskildu að samþykktarviðmiðunin sé uppfyllt.

Prófunaríðefnin eru sett á samfellda einlagið eftir fjarlægingu frumuræktunarmiðilsins og tvo þvotta með dauðhreinsaðri volgri (37 °C) HBSS-lausn sem inniheldur kalsíum (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM), án fenólrauðs litvísis. Skoða skal síurnar áður sjónrænt til að kanna hvort skemmdir séu til staðar sem ranglega væri hægt að rekja til hugsanlegs ósamrýmanleika við prófunaríðefni. Nota skal a.m.k. þrjú samhliða sýni fyrir hvern styrk prófunaríðefnisins og fyrir samanburðina í hverri keyrslu. Að loknum váhrifum í 1 mínútu við stofuhita skal prófunaríðefnið fjarlægt varlega með útsogi, einlagið skal þvegið tvisvar með dauðhreinsaðri volgri (37 °C) HBSS-lausn sem inniheldur kalsíum (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM), án fenólrauðs litvísis, og mæla skal flúrskinslausnarlekann án tafar.

Nota skal neikvæða og jákvæða samskeiða samanburði í hverri keyrslu til að sýna fram á að heilleiki einlagsins (neikvæður samanburður) og næmi frumnanna (jákvæður samanburður) séu innan skilgreinds, rannsóknarsögulegs ásættanleikasviðs. Ráðlagt jákvætt samanburðaríðefni er Brij 35 (Cas-nr. 9002-92-0) með 100 mg/ml. Þessi styrkur á að gefa u.þ.b. 30% flúrskinslausnarleka (viðunandi bil 20–40% flúrskinslausnarleki, þ.e. skemmdir á frumulaginu). Ráðlagt neikvætt samanburðaríðefni er HBSS-lausn sem inniheldur kalsíum (í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM), án fenólrauðs litvísis (ómeðhöndlað, samanburðarblankur). Einnig skal hafa samanburð með hámarksleka í hverri keyrslu til að hægt sé að reikna út FL_{20}-gildin. Hámarksleki er ákvarðaður með því að nota samanburðarinnskotsbolla án frumna.

Ákvörðun á gegndræpi flúrskinslausnar

Strax eftir fjarlægingu prófunar- og samanburðaríðefna skal bæta 400 µl af 0,1 mg/ml natríumflúrskinslausn (0,01% (massi miðað við rúmmál) í HBSS-lausn sem inniheldur kalsíum [í styrk sem nemur 1,0–1,8 mM], án fenólrauðs litvísis) í innskotsbollann (þ.e. Millicell-HA). Ræktirnar eru geymdar í 30 mínútur við stofuhita. Við lok viðstöðunnar með flúrskinslausn eru innskotsbollarnir fjarlægðir varlega úr hverri holu. Sjónræn skoðun er gerð á hverri síu og allar skemmdir sem kunna að hafa átt sér stað við meðhöndlun eru skráðar.

Magn flúrskinslausnar sem lak í gegnum einlagið og innskotsbollann er magngreint í lausninni sem var eftir í holunum eftir fjarlægingu innskotsbollanna. Mælingar eru gerðar með flúrskinslitrófsmæli við örvunar- og útgeislunarbylgjulengdir 485 nm og 530 nm, eftir því sem við á. Næmi flúrskinslitrófsmælisins skal stillt þannig að mesti tölulegur munurinn sé á milli hámarksflúrskinslausnarleka (innskotsbolli með engum frumum) og lágmarksflúrskinslausnarleka (innskotsbolli með samfelldu einlagi meðhöndlað með neikvæðum samanburði). Vegna munar á milli flúrskinslitrófsmæla sem eru notaðir er lagt til að nota næmi sem gefur flúrljómunarstyrk > 4000 í samanburðinum með hámarksflúrskinslausnarleka. Hámarksgildi FL skal ekki að vera hærra en 9999. Hámarksleki flúrljómunar ætti að vera innan línulegs bils þess flúrskinslitrófsmælis sem er notaður.

Túlkun á niðurstöðum og spálíkan

Magn flúrskinslausnarleka er í hlutfalli við skemmdir af völdum íðefna á þétttengjum. Hundraðshluti flúrskinslausnarleka fyrir hvern prófaðan styrkleika íðefnisins reiknast út frá FL-gildum sem fást fyrir prófunaríðefnið með vísun í FL-gildi úr neikvæðum samanburði (mæling á samfellda einlaginu af frumum sem er meðhöndlað með neikvæðum samanburði) og samanburði með hámarksleka (mæling á magni flúrskinslausnarleka í gegnum innskotsbolla án frumna).

Meðalstyrkur hámarksleka flúrskinslausnar = x

Meðalstyrkur 0% leka flúrskinslausnar (neikvæður samanburður) = y

Meðaltal 100% leka fæst með því að draga meðaltal 0% leka frá meðaltali hámarksleka,

þ.e. x – y = z

Hundraðshluti leka fyrir hvern fastaskammt er fenginn með því að draga 0% lekann frá meðalstyrk flúrljómunar úr hinum þremur samhliða prófunum (m) og deila í það gildi með 100% lekanum, þ.e. % FL = [(m-y) / z] × 100%, þar sem:

m = meðalstyrkur flúrljómunar úr hinum þremur samhliða prófunum fyrir viðkomandi styrk

% FL = hundraðshlutfall flúrskinslausnar sem lekur í gegnum frumulagið

Nota skal eftirfarandi jöfnu fyrir útreikninginn á íðefnisstyrknum sem veldur 20% FL:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

þar sem:

D = % hömlun

A = % skemmdir (20% flúrskinslausnarleki)

B = % flúrskinslausnarleki < A

C = % flúrskinslausnarleki > A

M_C = styrkur (mg/ml) af C

M_B = styrkur (mg/ml) af B

Þröskuldsgildið fyrir FL_{20} til að spá fyrir um hvort íðefni séu augnætandi eða mjög augnertandi er sett fram hér fyrir neðan:

FL_{20} (mg/ml)	HSK SÞ F&M	Reglugerð (EB) nr. 1272/2008 F&M	U.S. EPA F&M
≤ 100	1. undirflokkur	1. undirflokkur	I. undirflokkur

F&M: flokkun og merking

Mælt er með FL-prófunaraðferðinni eingöngu til að greina vatnsleysanleg augnætandi eða mjög augnertandi efni (1. undirflokkur HSK SÞ, 1. undirflokkur í reglugerð (EB) nr. 1272/2008, I. undirflokkur EPA) (sjá 1. og 10. lið).

Til að greina vatnsleysanleg íðefni (efni og blöndur) (3., 6. og 7. heimild) sem „kallar fram alvarlegan augnskaða“ (1. undirflokkur HSK SÞ/reglugerð (EB) nr. 1272/2008) eða sem „augnætandi eða mjög augnertandi“ (I. undirflokkur EPA), skal prófunaríðefnið framkalla FL_{20} -gildi ≤ 100 mg/ml.

Samþykkt niðurstaðna

Meðalgildi hámarksflúrskinslausnarleka (x) skal vera hærra en 4000 (sjá 31. lið), meðalgildi fyrir 0% leka (y) skal vera jafnt eða lægra en 300 og meðalgildi fyrir 100% leka (z) skal vera á bilinu 3700–6000.

Prófun telst samþykktarhæf ef jákvæði samanburðurinn framkallar 20–40% skemmdir á frumulaginu (mælt sem % flúrskinslausnarleka).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Gögn

Gögn úr hverri keyrslu fyrir hverja holu í samanburði skulu sett fram í töflu, (t.d. styrkgildi flúrljómunar og gögn um reiknaðan hundraðshluta flúrljómunar fyrir hvert prófunaríðefni, auk flokkunar). Auk þess skal tilgreina meðaltal ± staðalfrávik hverrar mælingar um sig í samhliða prófunum fyrir hverja keyrslu.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunar- og samanburðaríðefni:

— efnaheiti, s.s. byggingarheiti sem Upplýsingaþjónustan um íðefni (CAS) notar, og þar á eftir önnur þekkt heiti,

— CAS-númer íðefnis, ef þekkt,

— hreinleiki og samsetning efnisins eða blöndunnar (í hundraðshlutum miðað við þyngd) að því marki sem þær upplýsingar eru tiltækar,

— eðlisfræðilegir eða efnafræðilegir eiginleikar sem tengjast framkvæmd rannsóknarinnar (t.d. eðlisástand, rokgirni, pH-gildi, stöðugleiki, vatnsleysni og efnaflokkur),

— meðhöndlun prófunar- og samanburðaríðefnis fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun),

— geymsluskilyrði.

Rökstuðningur fyrir vali á prófunaraðferðinni og aðferðarlýsingunni sem eru notuð:

— skal innihalda atriði sem þarf að hafa í huga varðandi notkunarsvið og takmarkanir prófunaraðferðarinnar.

Prófunarskilyrði:

— lýsing á frumukerfinu sem er notað, þ.m.t. ósviknivottorð og staða frumulínu að því er varðar berfryminga,

— upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð,

— styrkur prófunaríðefnisins eða prófunaríðefnanna sem eru notuð,

— hversu lengi snerting við prófunaríðefnið varir,

— viðstöðutími með flúrskinslausn,

— lýsingar á öllum breytingum á prófunaraðferðinni,

— lýsing á þeim matsviðmiðunum sem eru notaðar,

— tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn líkansins (t.d. neikvæðan og jákvæðan samanburð, viðmiðunaríðefni, ef við á),

— upplýsingar um tæknilega hæfni sem rannsóknarstofan sýnir fram á.

Niðurstöður

— gögn úr hverju prófunaríðefni og samanburði í hverri keyrslu og hverri mælingu fyrir sig úr samhliða prófun skulu sett upp í töflu (þ.m.t. einstakar niðurstöður, meðaltal og staðalfrávik),

— afleidd flokkun/afleiddar flokkanir með tilvísun í spálíkanið og/eða ákvörðunarviðmiðanir sem eru notaðar,

— lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

— skal innihalda atriði varðandi niðurstöðu sem er ekki afdráttarlaus (35. liður: FL_{20} > 100 mg/ml) og frekari prófanir.

Ályktanir:

HEIMILDIR:

1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Aðgengilegt á: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

5) Kafli B.5 í þessum viðauka, Bráð augnerting/augnæting

6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Aðgengilegt á: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

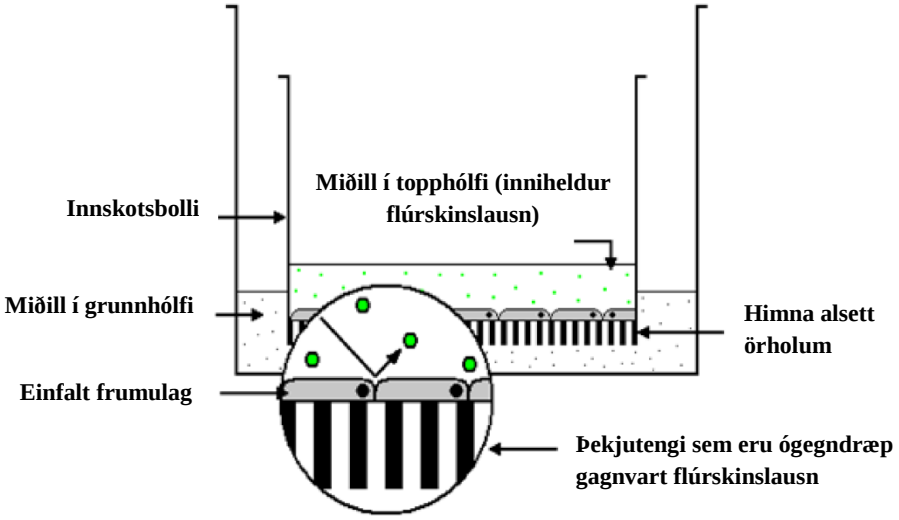
8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

———

1. viðbætir

SKÝRINGARMYND AF FRUMUM AF GERÐINNI MDCK SEM ERU RÆKTAÐAR Á HIMNU Í INNSKOTSBOLLA FYRIR FL-PRÓFUNARAÐFERÐINA

Samfellt einlag MDCK-frumna er ræktað á hálfgegndræpri himnu í innskotsbolla. Innskotsbollarnir eru settir í holurnar á bakka með 24 holum.



Mynd sótt frá: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

———

2. viðbætir

SKILGREININGAR

Nákvæmni: Mælikvarði á það hversu nálægt samþykktu viðmiðunargildi niðurstaða úr prófun er. Nákvæmni er mælikvarði á nothæfi prófunaraðferða og einn þáttur „gildis“. Hugtakið er oft notað í stað hugtaksins „samsvörun“ til að lýsa hlutfalli réttra niðurstaðna úr prófunaraðferð.

Íðefni: Efni eða blanda.

1. undirflokkur EPA: Íðefni sem framkalla ætandi áhrif (eyðing augnvefja sem gengur ekki til baka) eða áhrif á glæru eða viðvarandi ertingu í meira en 21 dag (2. heimild).

Reglugerð (EB) nr. 1272/2008 um flokkun, merkingu og pökkun efna og blandna: Hrindir í framkvæmd hnattsamræmdu kerfi SÞ til flokkunar íðefna (efna og blandna) innan Evrópusambandsins.

Falsneikvæðar niðurstöður: Hlutfall allra jákvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem neikvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

Falsjákvæðar niðurstöður: Hlutfall allra neikvæðra íðefna sem eru ranglega greind með prófunaraðferð sem jákvæð. Hlutfallið er ein vísbending um nothæfi prófunaraðferðar.

FL_{20}: Er hægt að áætla með því að ákvarða við hvaða styrkleika prófunaríðefnið veldur 20% flúrskinslausnarleka í gegnum frumulagið.

Flúrskinslausnarleki: Það magn flúrskinslausnar sem fer í gegnum frumulagið, mælt með flúrskinslitrófsmælingu.

HSK (hnattsamræmt kerfi Sameinuðu þjóðanna (SÞ) til flokkunar og merkingar íðefna): Kerfi til flokkunar íðefna (efna og blandna), samkvæmt stöðluðum tegundum og stigum eðlisrænnar hættu, heilbrigðishættu og umhverfishættu, sem tekur til samsvarandi hættuboðsatriða, s.s. skýringarmynda, viðvörunarorða, hættusetninga, varnaðarsetninga og öryggisblaða til að miðla upplýsingum um skaðleg áhrif þeirra til verndar fólki (þ.m.t. vinnuveitendum, launafólki, flytjendum, neytendum og bráðaliðum) og umhverfinu.

1. undirflokkur HSK: Vefjaskemmdir í auga eða alvarlega sjónskerðing, eftir að prófunaríðefni hefur verið sett á framflöt augans (2. heimild), sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá því það var sett á.

Hætta: Sá eðlislægi eiginleiki efnis eða aðstæðna að geta valdið skaðlegum áhrifum þegar lífvera, kerfi, hópur eða undirhópur kemst í snertingu við það efni.

Blanda: Notað með skírskotun til HSK SÞ er það tvö eða fleiri efni í blöndu eða lausn sem þau hvarfast ekki í.

Neikvæður samanburður: Ómeðhöndlað, samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis. Sýnið er unnið með sýnum, sem hafa verið meðhöndluð með prófunaríðefni og öðrum samanburðarsýnum, til að ákvarða hvort leysirinn víxlverkar við prófunarkerfið.

Ekki flokkað: Íðefni sem ekki flokkast í undirflokk HSK SÞ 1, 2A eða 2B, 1. eða 2. undirflokk í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 eða I., II. eða III. undirflokk augnertandi efna samkvæmt EPA.

Augnætandi efni: a) Íðefni sem veldur vefjaskemmdum í auga sem ganga ekki til baka. b) Íðefni sem flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ, 1. undirflokk í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 eða I. undirflokk augnertandi efna samkvæmt EPA.

Augnertandi efni: Íðefni sem framkallar breytingu, eftir að það er sett á framflöt augans, sem gengur til baka, b) íðefni sem flokkast sem augnertandi efni í HSK SÞ undirflokk 2A eða 2B, 2. undirflokk í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 eða II. eða III. undirflokk augnertandi efna samkvæmt EPA.

Mjög augnertandi efni: a) Íðefni sem veldur vefjaskemmdum í auganu, eftir að það er sett á framflöt augans, sem ganga ekki til baka innan 21 dags frá því það var sett á eða sem veldur alvarlegri sjónskerðingu. b) Íðefni sem flokkast í 1. undirflokk HSK SÞ, 1. undirflokk í reglugerð (EB) nr. 1272/2008 eða I. undirflokk augnertandi efna samkvæmt EPA.

Jákvæður samanburður: Samhliða sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis og er meðhöndlað með íðefni sem vitað er að framkallar jákvæða svörun. Til að tryggja að hægt sé að meta breytileika í svörun jákvæða samanburðarins yfir tíma skal þessi jákvæða svörun þó ekki vera yfirdrifin.

Hæfnisprófunaríðefni: Undirflokkur skrárinnar yfir viðmiðunaríðefni sem óreyndar rannsóknarstofur geta notað til að sýna fram á hæfni sína við fullgiltu viðmiðunarprófunaraðferðina.

Gildi: Lýsing á sambandi prófunarinnar og áhrifanna, sem miðað er við, og hvort sambandið hefur merkingu og er gagnlegt miðað við tiltekinn tilgang. Gildið lýsir því að hvaða marki prófunin nær að mæla rétt eða spá fyrir um líffræðilegu áhrifin sem miðað er við. Gildi felur í sér umfjöllun um nákvæmni (samsvörun) prófunaraðferðar (8. heimild).

Áreiðanleiki: Mælikvarði á það að hvaða marki er hægt að framkvæma prófunaraðferð með samanburðarnákvæmni hjá hverri rannsóknarstofu og hjá mismunandi rannsóknarstofum í tiltekinn tíma þegar hún er framkvæmd samkvæmt sömu aðferðarlýsingu. Áreiðanleiki er metinn með því að reikna út einseturssamanburðarnákvæmni og fjölsetra samanburðarnákvæmni og einsetursendurtekningarnákvæmni.

Staðgönguprófun: Prófun sem er hönnuð til að koma í stað prófunar, sem notuð er að staðaldri og samþykkt til hættugreiningar og/eða áhættumats, og sem hefur verið sýnt fram á að verndar heilbrigði manna eða dýra eða umhverfið, eftir því sem við á, til jafns við eða betur en samþykkta prófunin við allar hugsanlegar prófunaraðstæður og fyrir öll hugsanleg prófunaríðefni.

Næmi: Hlutfall allra jákvæðra/virkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Næmi er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvæg forsenda í mati á gildi prófunaraðferðar (8. heimild).

Alvarlegur augnskaði: Vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunaríðefni hefur verið sett á framflöt augans, sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags.

Samanburður með leysi eða burðarefni: Ómeðhöndlað sýni sem inniheldur alla þætti prófunarkerfis, þ.m.t. leysinn eða burðarefnið, og er unnið með sýnum, sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu, og með öðrum samanburðarsýnum til að ákvarða grunnviðmiðunarsvörun fyrir sýnin sem eru meðhöndluð með prófunaríðefninu, leystu í sama leysi eða burðarefni. Þegar þetta sýni er prófað með samskeiða, neikvæðu samanburðarsýni sýnir það einnig fram á hvort leysirinn eða burðarefnið víxlverkar við prófunarkerfið.

Sértæki: Hlutfall allra neikvæðra/óvirkra íðefna sem eru rétt flokkuð með prófuninni. Sértæki er mælikvarði á nákvæmni prófunaraðferðar sem gefur afdráttarlausar niðurstöður og er mikilvægur þáttur í mati á gildi prófunaraðferðar.

Efni: Notað með skírskotun til HSK SÞ sem frumefni og efnasambönd þeirra, náttúruleg eða framleidd, þ.m.t. öll aukefni, sem eru nauðsynleg til að viðhalda stöðugleika vörunnar, og öll óhreinindi, sem verða til í vinnslunni, en þó ekki leysiefni sem hægt er að skilja frá án þess að það hafi áhrif á stöðugleika efnisins eða breyti samsetningu þess.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófað með þessari prófunaraðferð.

Stigskipt prófunaráætlun: Þrepskipt prófunaráætlun þar sem allar upplýsingar um prófunaríðefnið eru rýndar í tiltekinni röð og notað til þess ferlið með vægi rökstuddra vísbendinga á hverju stigi til að ákvarða hvort fyrir liggja nægar upplýsingar til að taka ákvörðun um hættuflokkun áður en farið er á næsta stig. Ef hægt er að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga eru frekari prófanir ekki nauðsynlegar. Ef ekki er hægt að ákvarða ertingarmátt prófunaríðefnis á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga skal framkvæma þrepskipta raðprófun á dýrum þar til hægt er að flokka efnið með ótvíræðum hætti.

Fullgilt prófunaraðferð: Prófunaraðferð sem búið er að ljúka fullgildingarrannsóknum fyrir til að ákvarða gildi hennar (þ.m.t. nákvæmni) og áreiðanleika í tilteknum tilgangi. Mikilvægt er að taka mið af því að fullgilt prófunaraðferð er e.t.v. ekki nægilega nothæf, með tilliti til nákvæmni og áreiðanleika, til að teljast samþykktarhæf fyrir fyrirhugaðan tilgang (8. heimild).

Vægi rökstuddra vísbendinga: Ferli sem felst í því að vega og meta styrkleika og veikleika ýmissa upplýsinga til að komast að niðurstöðu um hugsanlega hættu af tilteknu íðefni og styðja þá niðurstöðu rökum.

———

3. viðbætir

HÆFNISEFNI FYRIR FL-PRÓFUNARAÐFERÐINA

Áður en þessi prófunaraðferð er tekin til reglubundinnar notkunar ættu rannsóknarstofur að sýna fram á tæknilega hæfni með því að greina rétt augnætingarflokkun fyrir þau 8 íðefni sem eru ráðlögð í töflu 1. Þau íðefni voru valin sem dæmigerð fyrir svörunarsvið staðbundinnar ertingar eða ætingar á augum samkvæmt niðurstöðum úr augnprófun í lífi á kanínum (viðmiðunarregla 405 um prófanir, prófunaraðferð B.5 (5. heimild)) (þ.e. flokkum 1, 2A, 2B eða engin flokkuð samkvæmt HSK SÞ). óflokkað Með hliðsjón af fullgiltri gagnsemi FL-greiningarinnar (þ.e. að greina aðeins efni sem eru augnætandi eða mjög augnertandi) eru það þó aðeins tvær prófunarniðurstöður sem miðast við flokkun (ætandi eða mjög ertandi efni eða ekki ætandi eða ekki mjög ertandi efni) sem gera kleift að sýna fram á hæfni viðkomandi rannsóknarstofu. Aðrar valviðmiðanir voru að íðefnin fengjust á almennum markaði, að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn um rannsóknir í lífi og að tiltæk væru hágæða tilvísunargögn fengin með FL-prófunaraðferðinni. Af þessum sökum voru valin hæfnisíðefni úr „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing“ (8. heimild) sem var notað í afturskyggnri fullgildingu á FL-prófunaraðferðinni.

Tafla 1

Íðefni sem eru ráðlögð til að sýna fram á tæknilega hæfni fyrir FL-prófunaraðferðina

Íðefni	CAS-nr.	Efnaflokkur ([1])	Eðlisástand	Flokkun í lífi ([2])	Flokkun í glasi ([3])
Bensalkóníumklóríð (5%)	8001-54-5	Óníumsamband	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Prómetazínhýdróklóríð	58-33-3	Amín/amidín, heturhringað, lífrænt brennisteinssamband	Fast efni	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Natríumhýdroxíð (10%)	1310-73-2	Basi	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
Natríumlárýlsúlfat (15%)	151-21-3	Karboxýlsýra (salt)	Vökvi	1. undirflokkur	Ætandi eða mjög ertandi efni
4-karboxýbensaldehýð	619-66-9	Karboxýlsýra, aldehýð	Fast efni	Undirflokkur 2A	Ekki ætandi efni/ekki mjög ertandi efni
Ammóníumnítrat	6484-52-2	Ólífrænt salt	Fast efni	Undirflokkur 2A	Ekki ætandi/ekki mjög ertandi efni
Etýl-2-metýlasetóasetat	609-14-3	Ketón, estri	Vökvi	Undirflokkur 2B	Ekki ætandi/ekki mjög ertandi efni
Glýseról	56-81-5	Alkóhól	Vökvi	Utan flokka	Ekki ætandi/ekki mjög ertandi efni

Skammstafanir: CAS-nr. = Skráningarnúmer hjá Upplýsingaþjónustu um íðefni

([1]) Hverju prófunaríðefni var skipað í íðefnaflokk með því að nota staðlað flokkunarkerfi, byggt á flokkunarkerfi National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (aðgengilegt á http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Byggt á niðurstöðum úr prófun í lífi á kanínuaugum (OECD-viðmiðunarregla 405 um prófanir, prófunaraðferð B.5) og með notkun hnattsamræmds kerfis Sameinuðu þjóðanna og reglugerðar (EB) nr. 1272/2008.

([3]) Byggir á niðurstöðum sem fást með FL-prófunaraðferðinni (71. aðferðarlýsing INVITTOX (6. heimild))

B.62 **Halastjörnumæling *í lífi* á spendýrafrumum við basísk skilyrði**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 489 um prófanir (2016). Halastjörnumæling í lífi við basísk skilyrði (rafdráttur stakra frumna á geli) (hér á eftir einfaldlega nefnd „halastjörnumælingin“) er notuð til að greina rofna DNA-þætti í frumum eða frumukjörnum sem eru einangruð úr margskonar dýravefjum, oftast úr nagdýrum, og látin komast í snertingu við efni sem gætu haft erfðaeiturhrif. Halastjörnumælingin hefur verið rýnd og ýmsir sérfræðingahópar hafa birt ráðleggingar um hana (1.–10. heimild). Þessi prófunaraðferð er hluti af röð aðferða við erfðafræðilegar eiturefnafræðiprófanir. Skjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar, sem veitir gagnorðar upplýsingar um prófanir varðandi erfðafræðilega eiturefnafræði og yfirlit yfir nýlegar breytingar sem voru gerðar á þessum viðmiðunarreglunum um prófanir (11. heimild), hefur verið þróað.

Tilgangurinn með halastjörnumælingunni er að greina íðefni sem valda DNA-skemmdum. Halastjörnumælingin getur, við basísk skilyrði (> pH 13), greint rof í ein- og tvíþáttum sem verða t.d. til vegna beinna verkana við DNA, staða sem eru viðkvæmir fyrir basa eða eru afleiðing tímabundins rofs DNA-þátta vegna DNA-viðgerðar með brottskurði. Þessi rofnu þræðir geta fengið viðgerð sem leiðir til áhrifa sem endast ekki, geta verið banvæn fyrir frumuna eða viðgerðin búið til stökkbreytingu sem veldur varanlegri lífvænni breytingu. Þau geta líka leitt til skemmda á litningum sem tengjast einnig mörgum sjúkdómum í mönnum, þ.m.t. krabbamein.

Formleg fullgildingarprófun á halastjörnumælingunni í lífi á nagdýrum var gerð á árunum 2006–2012, samræmd af Japansmiðstöðinni um fullgildingu staðgönguaðferða (JaCVAM) í tengslum við Evrópumiðstöðina um fullgildingu staðgönguaðferð (ECVAM), samræmingarnefnd stofnana um fullgildingu staðgönguaðferða (ICCVAM) og NTP samræmingarstofnunina fyrir mat á eiturefnafræðilegum staðgönguaðferðum (NICEATM) (12. heimild). Þessi prófunaraðferð nær yfir ráðlagða notkun og takmarkanir halastjörnumælingarinnar og er byggð á lokabókuninni (12. heimild), sem var notuð í fullgildingarrannsókninni, og á viðbótargögnum sem skipta máli, birtum og óbirtum (í eigu rannsóknarstofa).

Skilgreiningar á lykilhugtökum eru settar fram í 1. viðbæti. Tekið skal fram að hægt er að nota mismunandi verkvanga fyrir þessa mælingu (smásjárgler, gelbletti, 96-holu-bakka o.s.frv.). Til hægðarauka er heitið „sýnisgler“ notað hér á eftir í þessu skjali en það nær yfir alla hina verkvangana.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

Halastjörnumælingin er aðferð til að mæla rofna DNA-þætti í heilkjarnafrumum. Stakar frumur/kjarnar sem eru steyptar í agarósa á sýnisgleri er sundrað með þvottaefni og salti í háum styrk. Í þessu sundrunarþrepi leysast frumu- og kjarnahimnur sundur svo uppvafðar DNA-lykkjur, yfirleitt kallaðar kjarnasvæði og DNA-brot, losna. Við rafdrátt við hátt sýrustig myndast form sem minna á halastjörnur, sem hægt er að skoða með flúrljómunarsmásjárrannsókn með því að nota viðeigandi flúrljómunarlitun; DNA-brot færast frá höfðinu inn í halann eftir stærð sinni og styrkur halans í hlutfalli við heildarstyrkinn (höfuð + hali) endurspeglar umfang rofnunarinnar í DNA-inu (13.–15. heimild).

Halastjörnumælingin í lífi við basísk skilyrði hentar einkum til að meta hættu á erfðaeiturhrifum þar eð svaranirnar í mælingunni eru háðar upptöku, dreifingu, efnaskiptum og útskilnaði í lífi og einnig DNA-viðgerðarferlum. Það getur verið munur á þeim milli tegunda, vefja og gerða DNA-skemmda.

Til að uppfylla kröfur um velferð dýra, einkum til að draga úr notkun á dýrum (meginreglur um staðgöngu, fækkun og mildun) er einnig hægt að samþætta þessa mælingu við aðrar rannsóknir á eiturhrifum, t.d. rannsóknir á eiturhrifum við endurtekna skammta (10., 16. og 17. heimild) eða leggja saman endapunkt hennar og aðra eiturhrifaendapunkta, s.s. prófun í lífi á smákjörnum rauðkorna hjá spendýrum (18.–20. heimild). Halastjörnumælingin er oftast gerð á nagdýrum þótt henni hafi verið beitt á aðrar tegundir, spendýr sem önnur dýr. Notkun á öðrum tegundum en nagdýrum skal studd vísindalegum og siðferðislegum rökum, í hverju tilviki fyrir sig, og eindregið er mælt með því að halastjörnumælingin sé einungis gerð á öðrum tegundum en nagdýrum ef hún er hluti af annarri eiturhrifarannsókn og ekki sjálfstæð prófun.

Val á váhrifaleið og vef(jum), sem verða rannsökuð, skal ákvarðað á grundvelli allrar þekkingar á prófunaríðefnunum sem er tiltæk/fyrirfinnst, t.d. sú leið váhrifa á menn sem til stendur/búist er við að nota, efnaskipti og dreifing, möguleiki á áhrifum á snertistaðnum, byggingarleg hættumerki, önnur gögn um erfðaeiturhrif eða eiturhrif og tilgangur rannsóknarinnar. Þá er hægt að mæla hugsanleg erfðaeiturhrif prófunaríðefnanna í markvef(jum) m.t.t. krabbameinsvaldandi áhrifa og/eða annarra eiturhrifa. Mælingin er einnig talin gagnleg til frekari rannsóknar á erfðaeiturhrifum sem koma fram við prófun í glasi. Rétt þykir að gera halastjörnumælingu í lífi á vef sem verið er að rannsaka ef raunhæft er að vænta þess að sá vefur verði fyrir nægilegum váhrifum.

Umfangsmesta fullgilding mælingarinnar var í líkamsvefjum karlkyns rotta í samstarfsrannsóknum s.s. JaCVAM-prófuninni (12. heimild) og hjá Rothfuss *et al.* 2010 (10. heimild). Í alþjóðlegu JaCVAM-fullgildingarprófuninni voru lifrin og maginn notuð. Lifrin, af því hún er virkasta líffærið í efnaskiptum íðefna og oft líka marklíffæri krabbameinsvaldandi áhrifa. Maginn, af því hann er oftast fyrsti snertistaður íðefnanna eftir váhrif um munn, þótt einnig mætti taka til athugunar önnur svæði í meltingarveginum sem snertistað við vefi, s.s. skeifugörnina og ásgörnina, og þau gætu átt betur við um menn en kirtlaríki magi (e. *glandular stomach*) nagdýrsins. Þess skal gætt að tryggja að slíkir vefir komist ekki í snertingu við óhóflega háan styrkleika prófunaríðefnis (21. heimild). Að meginreglu til er hægt að beita tækninni á hvern þann vef sem hægt er að fá úr greinanlegar sviflausnir með stökum frumum/kjörnum. Gögn frá nokkrum rannsóknarstofum sem njóta einkaleyfisverndar sýna fram á árangursríka beitingu hennar á marga mismunandi vefi og til eru margar heimildir sem sýna fram á að hægt er að beita tækninni á önnur líffæri eða vefi en lifur og maga, t.d. ásgörn (22. heimild), nýru (23.–24. heimild), húð (25.–26. heimild) eða þvagblöðru (27.–28. heimild), frumur úr lungum og berkju- og lungnablöðruskolun (sem skiptir máli vegna rannsókna á íðefnum sem andað er inn) (29. og 30. heimild) og það hafa líka verið gerðar prófanir á mörgum líffærum í einu (31. og 32. heimild).

Þótt það geti verið áhugi á erfðaeiturhrifum í kímfrumum skal tekið fram að staðlaða halastjörnumælingin við basísk skilyrði, eins og henni er lýst í þessari prófunaraðferð, er ekki talin heppileg til að mæla rof DNA-þátta í þroskuðum kímfrumum. Þar eð greint var frá háum og breytilegum bakgrunnsgildum DNA-skemmda í fræðilegri samantekt um notkun halastjörnumælingarinnar fyrir erfðaeiturhrif á kímfrumur (33. heimild) eru breytingar á aðferðarlýsingu, ásamt betri rannsóknum til stöðlunar og fullgildingar, taldar nauðsynlegar áður en hægt er að setja halastjörnumælingu á þroskuðum kímfrumum (t.d. sæði) inn í prófunaraðferðina. Auk þess er ráðlagða váhrifafyrirkomulagið, sem er lýst í þessari prófunaraðferð, ekki ákjósanlegt og lengri váhrif eða sýnatökutímar væru nauðsynleg til að fá merkingarbæra greiningu á rofi DNA-þátta í þroskuðu sæði. Erfðaeiturhrifum í eistnafrumum á mismunandi stigum sérhæfingar, eins og þau mælast í halastjörnumælingunni, er lýst í heimildum (34. og 35. heimild). Þó skal tekið fram að kynkirtlar innihalda blöndu af líkams- og kímfrumum. Þess vegna eru jákvæðar niðurstöður í kynkirtlinum í heilu lagi (eistanu) ekki endilega til marks um skemmdir á kímfrumum; engu að síður eru þær vísbending um að íðefnið, eða íðefnin, sem er prófað og/eða umbrotsefni þess hafi náð til kynkirtilsins.

Ekki er hægt að greina víxltengi með áreiðanlegum hætti í halastjörnumælingunni við stöðluð tilraunaskilyrði. Við tiltekin breytt tilraunaskilyrði gæti verið hægt að greina DNA-DNA og DNA-prótín víxltengi og aðrar basabreytingar, s.s. oxaða basa (23. og 36.–39. heimild). Enn er þörf á frekari vinnu til að lýsa nauðsynlegum breytingum á aðferðarlýsingu nægilega vel. Því er greining á efnum sem valda víxltengslum ekki megintilgangur mælingarinnar eins og henni er lýst hér. Mælingin hentar ekki til greiningar á efnum sem valda mislitnun, ekki einu sinni með breytingum.

Vegna núverandi stöðu þekkingar tengjast nokkrar takmarkanir til viðbótar (sjá 3. viðbæti) halastjörnumælingunni í lífi. Búist er við að farið verði yfir prófunaraðferðina í framtíðinni og, ef nauðsyn krefur, hún endurskoðuð í ljósi fenginnar reynslu.

Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd til að fá gögn sem fyrirhugað er að nota í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu á viðeigandi hátt. Ítarleg lýsing á skömmtun og sýnatöku er sett fram í 36.–40 lið. Á völdum sýnatökutíma eða -tímum eru vefirnir, sem verið er að rannsaka, skornir frá og sviflausnir með stökum frumum/kjörnum eru undirbúnar (hægt er að framkvæma gegnflæði á staðnum ef það er talið gagnlegt, t.d. við lifur) og steyptir í mjúkan agar til að festa þá á sýnisgler. Frumur/kjarnar eru meðhöndluð með sundrunarjafnalausn til að fjarlægja frumu- og/eða kjarnahimnur og látin komast í snertingu við ramman basa, t.d. pH ≥13, til að gera DNA-inu kleift að sléttast út og til að sleppa útsléttuðum DNA-lykkjum og -brotum. DNA-ið í kjarnanum í agarnum er svo rafdregið. Eðlilegar og óbrotnar DNA-sameindir haldast á staðnum í agarnum þar sem DNA-ið úr kjarnanum hafði verið en öll DNA-brot og útsléttaðar DNA-lykkjur færast að forskautinu. Eftir rafdráttinn er DNA-ið gert sýnilegt með því að nota viðeigandi flúrljómunarlit. Efnablöndur skulu greindar með því að nota smásjá og sjálf- eða hálfsjálfvirk myndgreiningarkerfi. Umfang DNA-sins, sem hefur færst í rafdrættinum, og lengd færslu þess endurspegla magn og stærð DNA-brota. Það eru nokkrir endapunktar fyrir halastjörnumælinguna. Mælt hefur verið með að meta DNA-skemmdir með DNA-innihaldi í halanum (DNA í hala í hundraðshlutum eða styrk hala í hundraðshlutum) (12. og 40.–42. heimild). Eftir að nægilega margir kjarnar hafa verið greindir eru gögnin greind með viðeigandi aðferðum til að meta niðurstöður mælingarinnar.

Hafa ber í huga að breytingar á mismunandi þáttum aðferðafræðinnar, þ.m.t. undirbúningi sýnis, skilyrðum við rafdrátt, sjónrænum greiningarþáttum (t.d. styrk litunar, styrk smásjárperu og notkun smásjárfiltera og samspil við myndavél), og umhverfisskilyrðum (t.d. bakgrunnslýsing) hafa verið rannsakaðar og geta haft áhrif á færslu DNA (43.–46. heimild).

SANNPRÓFUN Á HÆFNI RANNSÓKNARSTOFU

Allar rannsóknarstofur skulu staðfesta rannsóknarhæfni vegna halastjörnumælingarinnar með því að sýna fram á getu til að fá fram sviflausnir með stökum frumum eða kjörnum af nægum gæðum fyrir hvern markvef eða markvefi í öllum tegundum sem eru notaðar. Gæði efnablandnanna skulu fyrst metin samkvæmt því hvort hundraðshlutar af DNA í hala, hjá dýrum sem hafa fengið meðhöndlun með burðarefni, falli innan lágmarkssviðs samanburðarnákvæmni. Nýleg gögn benda til þess að hópmeðaltal hundraðshluta af DNA í hala (byggt á meðaltali miðgilda – sjá 57. lið fyrir ítarlegri upplýsingar um þessi hugtök) í rottulifur skuli helst ekki fara yfir 6% sem ber saman við gildin í JaCVAM-fullgildingarprófuninni (12. heimild) og önnur birt gögn og gögn sem njóta einkaleyfisverndar. Ekki eru til næg gögn eins og er til að gefa ráðleggingar um kjörsvið eða ásættanleg svið fyrir aðra vefi. Þetta útilokar ekki notkun annarra vefja ef rök eru fyrir henni. Viðeigandi endurskoðun á framkvæmd halastjörnumælingarinnar í þeim vefjum skal koma fram í prófunarskýrslunni og tengjast birtum skrifum eða gögnum sem njóta einkaleyfisverndar. Í fyrsta lagi er æskilegt að hundraðshluti DNA í hala sé á lágu sviði í samanburðarmælingum til að mælisviðið sé nægt til að greina jákvæð áhrif. Í öðru lagi skulu allar rannsóknarstofurnar geta fengið aftur þær svaranir sem búist er við fyrir beina stökkbreytivalda og forstökkbreytivalda með öðrum verkunarháttum, eins og lagt er til í töflu 1 (29. lið).

Jákvæð efni er hægt að velja, t.d. úr JaCVAM-fullgildingarprófuninni (12. heimild), eða úr öðrum birtum gögnum (sjá 9. lið) ef við á, ef það er stutt rökum og ef þau sýna greinilega jákvæða svörun í vefjum sem verið er að rannsaka. Einnig skal sýna fram á getu til að greina veik áhrif þekktra stökkbreytivalda, t.d. EMS í litlum skömmtum, t.d. með því að staðfesta tengsl milli skammts og svörunar með hæfilegum fjölda skammta og bili á milli þeirra. Í fyrstu skal leitast við að beina athyglinni að því að staðfesta færni með þeim vefjum sem eru oftast notaðir, t.d. nagdýralifur, til að hægt sé að gera samanburð við gögn sem fyrir eru og þær niðurstöður sem búist er við (12. heimild). Um leið er hægt að safna gögnum um aðra vefi, t.d. maga/skeifugörn/ásgörn, blóð o.s.frv. Rannsóknarstofan þarf að sýna fram á hæfni sína fyrir alla einstaka vefi í öllum tegundum sem til stendur að rannsaka og þarf að sýna fram á að hægt sé að fá ásættanlega jákvæða svörun með þekktum stökkbreytivaldi (t.d. EMS) í þeim vef.

Safna skal gögnum um burðarefnissamanburð/neikvæðan samanburð til að sýna fram á samanburðarnákvæmni gagna um neikvæðar svaranir og til að tryggja að tæknilegum þáttum mælingarinnar hafi verið stjórnað rétt eða til að gefa til kynna að fastsetja þurfi rannsóknarsöguleg svið upp á nýtt (sjá 22. lið).

Tekið skal fram að þótt hægt sé að afla margskonar vefja við krufningu og vinna þá fyrir halastjörnugreiningu þarf rannsóknarstofan að hafa hæfni til að safna margskonar vefjum úr einu stöku dýri og tryggja þannig að mögulegar DNA-skemmdir glatist ekki og halastjörnugreiningin verði ekki óáreiðanleg. Tímalengdin milli aflífunar og töku vefjanna til vinnslu getur verið mikilvæg (sjá 44. lið).

Taka skal tillit til velferðar dýra meðan verið er að þróa hæfni fyrir þessa prófun og því er hægt að nota vefi úr dýrum sem voru notuð við aðrar prófanir meðan geta í ýmsum þáttum prófunarinnar er þróuð. Auk þess þarf ekki að vera nauðsynlegt að gera fullnaðarrannsókn meðan verið er að koma á fót nýrri prófunaraðferð á rannsóknarstofu og hægt er að nota færri dýr eða prófunarstyrkleika meðan nauðsynleg færni er þróuð.

Rannsóknarsöguleg samanburðargögn

Meðan á hæfnirannsóknunum stendur skal rannsóknarstofan byggja upp rannsóknarsögulegan gagnagrunn til að fastsetja svið jákvæðs og neikvæðs samanburðar og dreifingar fyrir vefi og tegundir sem skipta máli. Ráðleggingar um uppbyggingu rannsóknarsögulegra gagna og notkun þeirra (þ.e. viðmiðanir fyrir hvaða gögn eru höfð með og hver ekki í rannsóknarsögunni og ásættanleikaviðmiðanir fyrir tiltekna tilraun) er að finna í 47. heimild. Mismunandi vefir og tegundir, sem og mismunandi burðarefni og íkomuleiðir, geta gefið mismunandi gildi fyrir hundraðshluta DNA í hala í neikvæðum samanburði. Því er mikilvægt að fastsetja svið neikvæðs samanburðar fyrir hvern vef og tegund. Rannsóknarstofur skulu nota gæðastýringaraðferðir s.s. stýririt (t.d. „*C-charts*, *X-bar charts*“ (48. heimild)) til að greina hversu breytileg gögn þeirra eru og til að sýna að stjórnun aðferðanna á rannsóknarstofunni sé í lagi. Einnig gæti þurft bæta líkurnar á að veikari áhrif greinist (sjá 17. lið) með vali á viðeigandi efnum fyrir jákvæðan samanburð, skammtasvið og tilraunaskilyrði (t.d. skilyrði við rafdrátt).

Allar breytingar á aðferðarlýsingu tilraunar skulu gerðar með tilliti til samræmis þeirra við fyrirliggjandi rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um samanburði. Allt verulegt ósamræmi skal hafa í för með sér stofnun nýs rannsóknarsögulegs gagnagrunns um samanburði.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Undirbúningur

Val á dýrategund

Að jafnaði eru notuð ung, heilbrigð, fullvaxin nagdýr af algengum rannsóknarstofustofnum (6–10 vikna gömul við upphaf meðferðar þótt dálítið eldri dýr séu einnig ásættanleg). Val nagdýrategunda skal byggjast á i) tegundum sem eru notaðar í öðrum eiturhrifarannsóknum (til að hægt sé að bera saman gögn og gefa færi á samþættum rannsóknum), ii) tegundum sem mynduðu æxli í rannsókn á krabbameinsvaldandi eiginleikum (við rannsókn á gangvirki myndunar krabbameins) eða iii) tegundum með þau efnaskipti sem skipta mestu máli fyrir menn, ef þau eru þekkt. Rottur eru venjulega notaðar til þessarar prófunar. Þó er hægt að nota aðrar tegundir ef fyrir því eru siðferðileg og vísindaleg rök.

Aðbúnaður dýra og fóðrun

Fyrir rottur er æskilegur hiti í vistarverum tilraunadýranna 22 °C (±3 ºC). Æskilegt rakastig er 50–60%, a.m.k. 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunaríðefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Nagdýr skulu vera í búri í litlum hópum (venjulega ekki fleiri en fimm saman) af sama kyni, ef árásargirni er ekki vænst. Dýr mega aðeins vera hvert í sínu búri ef fyrir því eru vísindaleg rök. Nota skal gegnheil gólf ef þess er nokkur kostur þar eð gólf með möskvum geta valdið alvarlegum meiðslum (49. heimild). Veita skal viðeigandi umhverfisfjölbreytni.

Undirbúningur dýranna

Dýrunum er slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og látin laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga áður en rannsóknin hefst. Nota verður aðferðina með minnsta inngripinu til að auðkenna dýrin hvert um sig. Viðeigandi aðferðir eru m.a. merking með hring, ífestu spjaldi, örflögu og lífkenni. Ekki eru vísindaleg rök fyrir mörkun eyrna og afklippingu táa í þessum prófunum. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna að vera í lágmarki og ekki meiri en ± 20%.

Tilreiðsla skammta

Prófunaríðefni í föstu formi skulu leyst upp eða blönduð í sviflausn með viðeigandi burðarefnum eða blandað í fóður eða drykkjarvatn áður en þau eru skömmtuð dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunaríðefni óblönduð eða þynnt fyrir skammtagjöf. Ef greina á váhrif við innöndun má gefa prófunaríðefni sem gas, gufu eða sem fast/fljótandi úðaefni, allt eftir eðlisefnafræðilegum eiginleikum þeirra (50.–51. heimild).

Nota skal ferskar blöndur af prófunaríðefninu nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu og tiltaki viðeigandi geymsluskilyrði.

Prófunarskilyrði

Burðarefni

Burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunaríðefnin. Ef notuð eru lítt þekkt burðarefni skal notkunin studd tilvísunargögnum sem staðfesta samhæfi þeirra að því er varðar tilraunadýr, íkomuleið og endapunkt. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Hafa ber í huga að sum burðarefni (einkum seigfljótandi burðarefni) geta vakið bólgu og hækkað bakgrunnsgildi rofs DNA-þátta á snertistaðnum, einkum við margar inngjafir.

Samanburðir

Jákvæðir samanburðir

Eins og er skal að jafnaði hafa hóp a.m.k. 3 greiningarbærra dýra af sama kyni í hverri prófun, eða af hvoru kyni ef bæði eru notuð (sjá 32. lið), sem er meðhöndlaður með jákvæðu samanburðaríðefni. Í framtíðinni gæti verið unnt að sýna fram á nægа hæfni til að draga úr þörfinni á jákvæðum samanburðum. Ef notaðir eru margir sýnatökutímar (t.d. ef aðferðarlýsingin er með einni inngjöf) er einungis nauðsynlegt að hafa jákvæða samanburði með í einum sýnatökutíma en tryggja skal jafnvægi í tilhöguninni (sjá 48. lið). Það er ekki nauðsynlegt að inngjöf samskeiða jákvæðra samanburðarefna fari fram eftir sömu leið og er notuð fyrir prófunaríðefnið þótt það sé mikilvægt að nota sömu leið þegar verið er að mæla áhrif á snertistað. Sýna skal fram á að jákvæðu samanburðarefnin veki rof DNA-þátta í öllum vefjum sem er verið að rannsaka vegna prófunaríðefnisins og líklegt er að EMS sé valið sem jákvæða samanburðarefnið þar eð það hefur í för með sér rof DNA-þátta í öllum vefjum sem hafa verið rannsakaðir. Velja skal skammtastærðir jákvæðu samanburðaríðefnanna með tilliti til þess að framkalla meðalsterk áhrif til að meta megi frammistöðu og næmleika mælingarinnar á gagnrýninn hátt og hægt er að byggja þær á skammtasvörunarferlum sem eru ákvarðaðir af rannsóknarstofunni meðan hún sýnir fram á hæfni sína. Hundraðshluti DNA í hala í dýrum í samskeiða jákvæðum samanburði skal vera í samræmi við sviðið sem er fyrirfram ákvarðað á rannsóknarstofunni fyrir hvern vef um sig og sýnatökutíma fyrir þá tegund (sjá 16. lið). Dæmi um jákvæð samanburðaríðefni og suma af markvefjum þeirra (í nagdýrum) er að finna í töflu 1. Velja má önnur efni en þau sem eru gefin upp í töflu 1 ef fyrir því eru vísindaleg rök.

Tafla 1

Dæmi um jákvæð samanburðarefni og suma af markvefjum þeirra

Efni og CAS-nr.
Etýlmetansúlfónat (CAS-nr. 62-50-0) fyrir alla vefi
Etýlnítrósúrea (CAS-nr. 759-73-9) fyrir lifur og maga, skeifugörn eða ásgörn
Metýlmetansúlfónat (CAS-nr. 66-27-3) fyrir lifur, maga, skeifugörn eða ásgörn, frumur úr lungum og berkju- og lungnablöðruskolun (BAL), nýru, þvagblöðru, lungu, eistu og beinmerg/blóð
N-metýl-N′-nítró-N-nítrósógúanidín (CAS-nr. 70-25-7) fyrir maga, skeifugörn eða ásgörn
1,2-dímetýlhýdrasín 2HCl (CAS-nr. 306-37-6) fyrir lifur og þarma
N-metýl-*N*-nítrósóúrea (CAS-nr. 684-93-5) fyrir lifur, beinmerg, blóð, nýru, maga, ásgörn og heila.

Neikvæðir samanburðir

Í hvert skipti sem sýni eru tekin og fyrir hvern vef skal hafa með neikvæðan samanburðarhóp dýra sem er meðhöndlaður einvörðungu með burðarefni og að öðru leyti meðhöndlaður á sama hátt og meðferðarhóparnir. Hundraðshluti DNA í hala í dýrum í neikvæðum samanburði skal vera innan bakgrunnssviðs sem er fyrirfram ákvarðað á rannsóknarstofunni fyrir hvern vef um sig og sýnatökutíma fyrir þá tegund (sjá 16. lið). Ef ekki eru fyrir hendi rannsóknarsöguleg eða útgefin samanburðargögn sem sýna að burðarefnið sem varð fyrir valinu veki ekki skaðleg áhrif eða erfðaeiturhrif með inngjafafjöldanum eða með íkomuleiðinni skal gera upphafsrannsóknir áður en fullnaðarrannsóknin er gerð til að byggja upp ásættanleika fyrir burðarefnissamanburðinn.

VERKFERLI

Fjöldi og kyn dýra

Þótt lítið sé til af gögnum um kvendýr, sem hægt er að nota til að gera samanburð á kynjunum í tengslum við halastjörnumælinguna, eru aðrar erfðaeiturhrifasvaranir *í lífi* almennt líkar í karl- og kvendýrum og því má gera flestar prófanir á hvoru kyni sem er. Gögn sem sýna fram á mismun sem máli skiptir á milli karl- og kvendýra (t.d. mismun á altækum eiturhrifum, efnaskiptum, lífaðgengi o.s.frv., sem dæmi úr skammtastærðarannsókn) styðja notkun á báðum kynjum. Í því tilviki getur verið rétt að gera rannsókn á báðum kynjum, t.d. sem hluta af rannsókn á eiturhrifum við endurtekna skammta. Það gæti verið rétt að nota þáttbundna tilhögun ef bæði kynin eru notuð. Upplýsingar um hvernig á að greina gögnin með notkun þessarar tilhögunar er að finna í 2. viðbæti.

Hópastærðir við upphaf rannsóknarinnar (og meðan verið er að sýna fram á hæfni) skulu ákvarðaðar með það fyrir augum að með þeim fáist a.m.k. 5 greiningarbær dýr af öðru kyninu, eða af hvoru kyni ef bæði er notuð, á hvern hóp (færri í samskeiða jákvæða samanburðarhópnum – sjá 29. lið). Ef váhrif á menn frá íðefnum eru hugsanlega kynbundin, eins og raunin er með sum lyfjaefni, skal prófunin fara fram á því kyni sem við á hverju sinni. Til leiðbeiningar varðandi dæmigerðan hámarksfjölda dýra myndi rannsókn, sem er gerð í samræmi við þættina sem eru fastsettir í 33. lið, með þremur skammtahópum og samskeiða neikvæðum og jákvæðum samanburði (hver hópur samanstendur af fimm dýrum af sama kyninu), að hámarki útheimta á bilinu 25 til 35 dýr.

MEÐFERÐARÁÆTLUN

Dýrin skulu fá meðferð daglega á tímabili sem nær yfir tvo eða fleiri daga (þ.e. tvær eða fleiri meðferðir með u.þ.b. 24 tíma hléum) og sýni skulu tekin einu sinni 2–6 klst. eftir síðustu meðferð (eða við T_{max}) (12. heimild). Sýni samkvæmt langvarandi skömmtunarfyrirkomulagi (t.d. daglegir skammtar í 28 daga) teljast gild. Sýnt hefur verið fram á vel heppnaða samsetningu halastjörnumælingarinnar og prófunar á smákjörnum rauðkorna (10. og 19. heimild). Þó skal athuga vandlega ferilstjórnun í tengslum við sýnatöku úr vefjum fyrir halastjörnugreiningu ásamt kröfum um sýnatöku úr vefjum fyrir aðrar gerðir eiturefnafræðilegs mats. Heimt (e. *harvest*) 24 klst. eftir síðasta skammtinn, sem er dæmigert fyrir almennar eiturhrifarannsóknir, á í flestum tilvikum ekki við (sjá 40. lið um sýnatökutíma). Notkun annarra meðferðar- og sýnatökuáætlana skal rökstudd (sjá 3. viðbæti). Til dæmis er hægt að nota eina meðferð með mörgum sýnatökum en þó skal haft í huga að rannsókn með einni inngjöf útheimtir fleiri dýr því þá þarf margar sýnatökur en af og til getur þetta verið betra, t.d. ef prófunaríðefnið vekur óhófleg eiturhrif eftir endurtekna inngjöf.

Hvernig svo sem prófunin er gerð er það ásættanlegt svo fremi sem prófunaríðefnið gefi jákvæða svörun eða, ef um neikvæða rannsókn er að ræða, svo fremi sem sýnt er fram á beinar eða óbeinar vísbendingar sem styðja váhrif af eða eiturhrif á markvefinn eða markvefina, eða ef háskammti er náð (sjá 36. lið).

Prófunaríðefni má einnig gefa inn í tveimur áföngum, þ.e. meðferðin skiptist í tvær gjafir á sama degi og skulu ekki líða nema 2–3 klukkustundir á milli en þannig er auðveldara að gefa inn mikið rúmmál. Undir þessum kringumstæðum skal áætlun um sýnatökutíma byggð á tímasetningu síðustu skömmtunar (sjá 40. lið).

Skammtastærðir

Ef engin nothæf gögn liggja fyrir úr öðrum rannsóknum, sem við eiga og gagnast við val á skömmtum, og framkvæmd er forprófun til að ákvarða skammtastærðir skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni, kyni og meðferðaráætlun og á að nota í meginrannsóknninni samkvæmt gildandi nálgunum við framkvæmd skammtastærðarannsókna. Markmið rannsóknarinnar skal vera að greina hámarksþolsskammt, skilgreindur sem skammturinn sem vekur smávægileg eiturhrif í hlutfalli við lengd rannsóknartímabilsins (t.d. greinileg klínísk einkenni, s.s. óeðlilegt atferli eða viðbrögð, minni háttar þyngdartap eða frumueiturhrif í markvef) en ekki dauða eða merki um sársauka, þjáningar eða hræðslu sem gerir aflífun nauðsynlega. Ef um er að ræða prófunaríðefni sem er ekki eitrað, með inngjafartímabil sem er 14 dagar eða lengra, er hámarksskammturinn (mörkin) 1000 mg/kg líkamsþyngd/dag. Ef inngjafartímabil eru styttri en 14 dagar er hámarksskammturinn (mörkin) 2000 mg/kg líkamsþyngd/dag. Þessi mörk geta verið breytileg ef um er að ræða tilteknar gerðir prófunaríðefna (t.d. lyf handa mönnum) sem falla undir sérreglur.

Íðefni sem sýna mettun eiturefnahvarfaeiginleika, eða vekja afeitrunarferla sem geta leitt til minnkunar á váhrifum eftir langtímainngjöf, geta verið undantekningar frá viðmiðunum um skammtaákvörðun og þau skulu metin í hverju tilviki fyrir sig

Velja skal a.m.k. tvær stigminnkandi skammtastærðir til viðbótar, með hæfilegu bili (helst minna en $\sqrt{10}$) fyrir hvern sýnatökutíma, til að sýna fram á vensl svörunar og skammtastærðar fyrir bæði bráð eiturhrif-útgáfuna og meðalbráð eiturhrif-útgáfuna af halastjörnumælingunni, auk hámarksskammts (hámarksþolsskammturinn, hámarksváhrif eða háskammtur). Þær skammtastærðir sem eru notaðar skulu þó helst einnig spanna bilið frá mestu eiturhrifum niður í lítil eða engin eiturhrif. Ef eiturhrif í markvefjum koma fram við allar skammtastærðirnar sem eru prófaðar er ráðlagt að gera frekari rannsóknir á skömmtum sem eru ekki eitraðir (sjá 54.–55. lið). Í rannsóknum, sem eru ætlaðar til að kanna nánar lögun skammtasvörunarferilsins, getur þurft viðbótarskammtahóp eða -hópa.

Gjöf skammta

Taka skal tillit til fyrirséðrar váhrifaleiðar fyrir menn við tilhögun mælingar. Því má velja íkomuleiðir váhrifa, s.s. með fæðu, drykkjarvatni, staðbundnar, undir húð, um munn (með magaslöngu), með innöndun, í bláæð eða með ígræðslu, sem færð eru rök fyrir. Í öllum tilvikum skal velja íkomuleið sem tryggir nægileg váhrif á markvef(i). Alla jafna er ekki mælt með innsprautun í kviðarhol þar eð hún er ekki dæmigerð, viðeigandi váhrifaleið fyrir menn og aðeins skal nota hana ef sérstök rök styðja það (t.d. vegna sumra jákvæðra samanburðarefna, til rannsóknar eða fyrir sum lyf sem eru gefin inn í kviðarhol). Hámarksrúmmál vökva sem hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100g líkamsþyngdar. Ef meira rúmmál en það er notað (ef löggjöf um velferð dýra heimilar það) skal það rökstutt. Ef þess er nokkur kostur skal ná mismunandi skammtastærðum með því að stilla styrkleika samsetningar skammtanna til að tryggja stöðugt rúmmál í hlutfalli við líkamsþyngdina við allar skammtastærðir.

Sýnatökutími

Sýnatökutíminn er mikilvæg breyta af því hann afmarkast af því tímabili sem prófunaríðefnið þarf til að ná hámarksstyrk í markvefnum og til að vekja rof DNA-þráða en lýkur áður en rofin eru fjarlægð, gert við þau eða þau leiða til frumudauða. Sumar skemmdir, sem leiða til rofs í DNA-þáttum og greinast með halastjörnumælingunni, geta haft mjög stuttan endingartíma, a.m.k. með sumum íðefnum sem eru prófuð í glasi (52. og 53. heimild). Vakni grunur um slíkar hverfular DNA-skemmdir skal gera ráðstafanir til samræmis við það til að draga úr tjóni með því að tryggja að sýni séu tekin úr vefjunum nægilega snemma, mögulega fyrr en á sjálfgefnu tímunum sem eru gefnir upp hér á eftir. Besti sýnatökutíminn eða -tímarnir geta verið íðefna- eða íkomuleiðarsértækir og leitt til, svo dæmi sé tekið, hraðra váhrifa á vefi með inngjöf í bláæð eða váhrifa við innöndun. Til samræmis við það skal ákvarða sýnatökutíma út frá gögnum um hraðafræði (t.d. við tímann (T_{max}) sem er toppurinn sem styrkurinn (C_{max}) nær í blóðvökva eða vefjum eða við stöðugt ástand ef um er að ræða margar inngjafir), ef þau eru tiltæk. Ef ekki eru til gögn um hraðafræði er heppileg málamiðlun vegna mælingar á erfðaeiturhrifum að taka sýni 2–6 klst. eftir síðustu meðferð, ef meðferðirnar eru tvær eða fleiri, eða bæði 2–6 klst. og 16–26 klst. eftir eina inngjöf þótt þess skuli gætt að kryfja öll dýr á sama tíma eftir síðasta (eða eina) skammtinn. Einnig er hægt að nota upplýsingar um birtingu eiturhrifa í marklíffærum (ef þær eru tiltækar) til að velja viðeigandi sýnatökutíma.

Athuganir

Gera skal almennar, klínískar athuganir sem tengjast heilbrigði dýranna og skrá þær a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af tímanum þegar eiturhrifin, sem vænst er, ná toppi eftir skammtagjöf (54. heimild). Öll dýr skulu skoðuð a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til dánar- og veikindatilvika. Í rannsóknum sem ná yfir lengri tíma skal vega öll dýr a.m.k. einu sinni í viku og við lok prófunartímabilsins. Mæla skal fóðurát í hvert sinn sem skipt er um fóður og a.m.k. vikulega. Ef prófunaríðefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju í hvert skipti þegar skipt er um vatn og a.m.k. vikulega. Dýr sem sýna merki um umframeiturhrif sem ekki eru banvæn skulu aflífuð áður en prófunartímabilinu lýkur og eru almennt ekki notuð í halastjörnugreininguna.

Vefjasöfnun

Þar eð mögulegt er að rannsaka vakningu á rofi DNA-þátta (halastjörnur) í svo til öllum vefjum skal skilgreina á skýran hátt rökin fyrir valinu á vefnum, eða vefjunum, sem skal taka og byggja á tilganginum með rannsókninni og á öllum fyrirliggjandi gögnum um upptöku, dreifingu, efnaskipti og útskilnað, erfðaeiturhrif, krabbameinsvaldandi áhrif eða önnur eiturhrifagögn vegna prófunaríðefnisins sem verið er að rannsaka. Meðal mikilvægra þátta sem hafa skal í huga er íkomuleiðin (á grunni líklegra(r) váhrifaleiða(r) fyrir menn), dreifingin og upptakan sem gert er ráð fyrir í vefjum, hlutverk efnaskipta og hugsanlegur verkunarmáti prófunaríðefnisins. Lifrin er sá vefur sem hefur oftast verið rannsakaður og sem mest gögn eru til um. Ef bakgrunnsupplýsingar vantar og ef ekki eru skilgreindir sérstakir vefir til að rannsaka er því

réttlætanlegt að taka sýni úr lifrinni þar eð hún er aðalsvæði efnaskipta líframandi efna og verður oft fyrir miklum váhrifum af móðurefni eða -efnum og umbrotsefni eða -efnum. Í sumum tilvikum getur rannsókn á stað beinnar snertingar skipt mestu máli (t.d. fyrir íðefni sem eru gefin um munn; kirtlaríki maginn eða skeifugörn/ásgörn eða, ef íðefnunum er andað inn, lungun). Velja skal viðbótarvefi eða aðra vefi, á grundvelli þeirra tilteknu ástæðna sem eru fyrir því að prófunin er gerð, en það getur verið gagnlegt að rannsaka margar gerðir vefja í sömu dýrum að því tilskildu að rannsóknarstofan hafi sýnt fram á hæfni vegna þeirra vefja og getu til að vinna með margar tegundir vefja í einu.

Tilreiðsla sýna

Að því er varðar ferlana sem er lýst í eftirfarandi liðum (44.–49.) er mikilvægt að allar lausnir eða stöðugar sviflausnir séu notaðar innan fyrningardagsetningar þeirra eða séu nýtilreiddar ef þess þarf. Einnig á við, að því er varðar eftirfarandi liði, að tímarnir sem fara í að i) fjarlægja hvern vef eftir krufningu, ii) vinna hvern vef í sviflausn með frumum/kjörnum og iii) vinna sviflausnina og tilreiða sýnisglerin, eru allir taldir mikilvægar breytur (sjá Skilgreiningar í 1. viðbæti) og ásættanleg lengd tíma sem fer í hvert þessara þrepa skal ákvörðuð meðan aðferðin er staðfest og sýnt fram á hæfnina.

Dýrin eru aflífuð, í samræmi við löggjöf sem gildir um velferð dýra og meginreglurnar um staðgöngu, fækkun og mildun, á viðeigandi tíma, eða tímum, eftir síðustu meðferð með prófunaríðefni. Valdur vefur eða valdir vefir eru fjarlægðir, skornir til og hluti af þeim tekinn fyrir halastjörnumælinguna um leið og skorinn er hluti af sama vefjahluta og settur í formaldehýðlausn eða viðeigandi festiefni fyrir mögulega vefjameinafræðilega greiningu (sjá 55. lið) í samræmi við staðalaðferðir (12. heimild). Vefurinn í halastjörnumælinguna er settur í hökkunarjafnalausn, skolaður nægilega með kaldri hökkunarjafnalausn til að fjarlægja blóðleifar og geymdur í ískaldri hökkunarjafnalausn þar til hann er unninn. Einnig má framkvæma gegnflæði á staðnum, t.d. fyrir lifur, nýru.

Mikið er til af birtum aðferðum til að einangra frumur/kjarna. Þar á meðal er að hakka vefi, s.s. úr lifur og nýra, skrapa yfirborð slímhúðar ef um meltingarveginn er að ræða, jöfnun og ensímniðurbrot. Í fullgildingarprófun JaCVAM voru einungis rannsakaðar einangraðar frumur og þær eru því ákjósanlegar með tilliti til þess að staðfesta aðferðina og til að geta vísað í prófunargögn frá JaCVAM til að sýna fram á hæfni. Þó hefur verið sýnt fram á að það var enginn grundvallarmunur á niðurstöðum mælingarinnar, hvort sem notaðar voru einangraðar frumur eða kjarnar (8.heimild). Aðrar aðferðir til að einangra frumur/kjarna (t.d. að gera þær einsleitar, mala, nota ensímniðurbrot og sía gegnum möskva) gefa einnig samanburðarhæfar niðurstöður(55. heimild). Af þessum sökum er hægt að nota hvort heldur sem er einangraðar frumur eða einangraða kjarna. Rannsóknarstofa skal meta vandlega og fullgilda vefjasértækar aðferðir til að einangra staka frumu/kjarna. Eins og fram kemur í 40. lið geta sumar skemmdir, sem leiða til rofs í DNA-þáttum og greinast með halastjörnumælingunni, haft mjög stuttan endingartíma (52. og 53. heimild). Því er mikilvægt, burtséð frá því hvaða aðferð er notuð til að tilreiða sviflausnina með stökum frumum/kjörnum, að vefirnir séu unnir um leið og hægt er eftir að dýrin hafa verið aflífuð og þeir hafðir við skilyrði sem draga úr því að skemmdir hverfi (t.d. með því að hafa vefinn við lágt hitastig). Frumusviflausnunum skal haldið ísköldum þar til þær eru tilbúnar til notkunar svo að breytileiki milli sýna sé í lágmarki og hægt sé að sýna fram á viðeigandi svaranir í jákvæðum og neikvæðum samanburðum.

TILREIÐSLA SÝNISGLERJA

Sýnisgler skulu tilreidd eins fljótt og hægt er (helst innan klukkustundar) eftir að stöku frumurnar/kjarnarnir eru tilreidd en hitastigið og tíminn frá því að dýrið deyr og sýnisglerið er tilreitt skulu vandlega stillt og fullgilt við skilyrði innan rannsóknarstofunnar. Rúmmál frumusviflausnarinnar, sem er bætt í agarósa með lágt bræðslumark (alla jafna 0,5–1,0%) til að útbúa sýnisglerin, skal ekki minnka hundraðshlutfall agarósans með lága bræðslumarkið niður fyrir 0,45%. Kjörþéttleiki frumna ákvarðast af myndgreiningartækinu sem er notað til að telja halastjörnurnar.

Sundrun

Skilyrði við sundrun eru líka mikilvæg breyta og geta haft áhrif á rof þáttanna sem verða vegna tiltekinna gerða DNA-breytinga (tiltekin DNA-alkýl og viðbætur á basa). Því er mælt með því að skilyrði við sundrun séu höfð eins stöðug og hægt er fyrir öll sýnisgler í tilrauninni. Þegar búið er að tilreiða sýnisglerin skulu þau höfð í kafi í kældri sundrunarlausn í a.m.k. eina klukkustund (eða yfir nótt) við 2–8 °C við dauf birtuskilyrði, t.d. við gult ljós (eða við ljósheld skilyrði) sem koma í veg fyrir að á þær skíni hvítt ljós sem í geta verið efnisþættir með útfjólublåa virkni. Eftir þetta viðstöðutímabil skulu sýnisglerin skoluð til að fjarlægja leifar þvottaefnis og salta áður en kemur að útsléttingarþrepi í basa. Þetta er hægt að gera með því að nota hreinsað vatn, hlutleysingar- eða fosfatjafnalausn. Einnig er hægt að nota rafdráttarjafnalausn. Þetta viðheldur basísku skilyrðunum í rafdráttarhólfinu.

Útslétting og rafdráttur

Staðsetja skal sýnisgler af handahófi á verkvang í rafdráttareiningu sem er undir vatni og inniheldur nógu mikið af rafdráttarlausn til þess að fljóti alveg yfir yfirborð sýnisglerjanna (einnig skal vera samkvæmni í dýptinni frá keyrslu til keyrslu). Í öðrum gerðum rafdráttareininga fyrir halastjörnumælingu, þ.e. með virkri kælingu, hringrás og aflgjafa með mikla afkastagetu, hefur meiri dýpt á lausninni, sem flýtur yfir, í för með sér hærri rafstraum meðan spennunni er haldið stöðugri. Hafa skal jafnvægi við tilhögun þess að staðsetja sýnisgler í rafdráttarkerið til að milda áhrif af allri leitni eða randtruflun innan kersins og til að lágmarka breytileika milli lotna, þ.e. hafa skal sama fjölda sýnisglerja frá hverju dýri í rannsókninni í hverri rafdráttarkeyrslu og taka með sýni úr mismunandi skammtahópum, neikvæðum samanburði og jákvæðum samanburði. Sýnisglerin skulu skilin eftir í a.m.k. 20 mínútur til þess að DNA-ið sléttist út og síðan sett í rafdrátt við stýrð skilyrði sem hámarka næmi og svið mælingarinnar (þ.e. hafa í för með sér ásættanlegt magn af hundraðshluta DNA í hala fyrir neikvæðan og jákvæðan samanburð en það hámarkar næmið). Umfang DNA-færslunnar tengist lengd rafdráttarins línulega og einnig spennunni (V/cm). Samkvæmt JaCVAM-prófuninni ætti hún að vera 0,7 V/cm í a.m.k. 20 mínútur. Lengd rafdráttar er talin mikilvæg breyta og stilla skal rafdráttartímann þannig að mælisviðið sé í hámarki. Lengri rafdráttartímar (t.d. 30–40 mínútur til að hámarka næmið) leiða yfirleitt til sterkari jákvæðra svarana með þekktum stökkbreytivöldum. Lengri rafdráttartímar geta þó einnig leitt til óhóflegrar færslu í samanburðarsýnum. Spennunni skal haldið stöðugri í hverri tilraun og breytileiki hinna þáttanna skal vera innan þröngs og skilgreinds sviðs, t.d. gaf 0,7 V/cm upphafsstraum sem var 300 mA í JaCVAM-prófuninni. Dýpi jafnalausnarinnar skal stillt þannig að nauðsynleg skilyrði náist og haldið alla tilraunina. Skrá skal strauminn við upphaf og lok rafdráttartímabilsins. Kjörskilyrðin skulu því ákvörðuð þegar rannsóknarstofan sýnir upphaflega fram á hæfni sína varðandi alla vefi sem eru rannsakaðir. Hitastigi rafdráttarlausnarinnar meðan á útsléttingu og rafdrætti stendur skal haldið lágu, yfirleitt við 2–10 °C (10. heimild). Skrá skal hitastig rafdráttarlausnarinnar við upphaf útsléttingar, upphaf rafdráttar og við lok rafdráttar.

Þegar rafdrættinum er lokið skulu sýnisglerin látin liggja í/skoluð í hlutleysingarjafnalausninni í a.m.k. 5 mínútur. Gel er hægt að lita og telja á því meðan það er „ferskt“ (t.d. innan 1–2 daga) eða þurrka það svo hægt sé að telja á því síðar (t.d. innan 1–2 vikna frá litun) (56. heimild). Skilyrðin skulu þó fullgilt meðan sýnt er fram á hæfni og rannsóknarsöguleg gögn skulu fengin og geymd fyrir hvora af þessum aðferðum. Ef um er að ræða hið síðarnefnda skal þurrka sýnisglerin með því að láta þau liggja í hreinu etanóli í a.m.k. 5 mínútur, leyfa þeim að loftþorna og þau síðan geymd, annaðhvort við stofuhita eða í íláti í kæliskáp, þar til talið er á þeim.

Mæliaðferðir

Gera skal magnbundna talningu á halastjörnum með því að nota sjálfvirkt eða hálfsjálfvirkt myndgreiningarkerfi. Sýnisglerin eru lituð með viðeigandi flúrljómandi lit, t.d. SYBR Gold, Green I, própidíumjoðíði eða etidíumbrómíði, og mæld með hæfilegri stækkun (t.d. 200x) í flúrsmásjá með ofanlýsingu og viðeigandi skynjurum eða með stafrænni myndavél (t.d. ljósflögumyndavél).

Flokka má frumur í þrjá flokka, eins og lýst er í kortabók yfir halastjörnumyndir (e. *the atlas of comet images*) (57. heimild), þ.e. teljanlegar, ekki teljanlegar og „broddgeltir“ (sjá frekari umfjöllun í 56. lið). Aðeins skal taka með teljanlegar frumur (greinilegt höfuð og hali án truflunar af nærliggjandi frumum) vegna hundraðshluta DNA í hala til að forðast gervinga. Það er engin þörf á því að greina frá tíðni frumna sem eru ekki teljanlegar. Ákvarða skal tíðni broddgalta á grundvelli sjónrænnar talningar (þar eð skýrt afmarkað höfuð er ekki fyrir hendi eru þeir ekki auðgreinanlegir með myndgreiningarkerfi) á a.m.k. 150 frumum í hverju sýni (sjá frekari umfjöllun í 56. lið) og hún skráð aðskilið.

Öll sýnisgler til greiningar, þ.m.t. jákvæður og neikvæður samanburður, skulu kóðuð hvert um sig og talin „blindandi“ svo að talningafólk þekki ekki til meðferðaraðstæðna. Fyrir hvert sýni (úr hverjum vef úr hverju dýri) skal greina a.m.k. 150 frumur (að undanskildum broddgöltum, sjá 56. lið). Talning 150 frumna fyrir hvert dýr í a.m.k. 5 dýrum í hverjum skammti (færri í samskeiða jákvæðum samanburði, sjá 29. lið) sýnir fram á viðunandi tölfræðilegan styrk samkvæmt greiningu Smith *et al*., 2008 (5. heimild). Ef sýnisgler eru notuð er hægt að gera þetta með 2 eða 3 sýnisglerjum, sem búið er að telja á, fyrir hvert sýni þegar notuð eru fimm dýr í hóp. Skoða skal nokkur svæði á sýnisglerinu við þéttleika sem tryggir að halarnir skarist ekki. Forðast skal að telja við brúnir sýnisglerja.

Hægt er að mæla rofna DNA-þætti í halastjörnumælingunni með óháðum endapunktum s.s. DNA í hala í hundraðshlutum, lengd hala og vægi (e. *moment*). Allar mælingarnar þrjár er hægt að framkvæma ef notað er viðeigandi hugbúnaðarkerfi til myndgreiningar. Þó er mælt með DNA í hala í hundraðshlutum (einnig þekkt sem styrkur hala í hundraðshlutum) fyrir mat og túlkun á niðurstöðum (12. og 40.–42. heimild) og það ákvarðast af styrk DNA-brota í halanum, gefinn upp sem hundraðshluti af heildarstyrk frumunnar (13. heimild).

Vefjaskemmdir og frumueiturhrif

Jákvæðar niðurstöður í halastjörnumælingunni kunna þó að stafa af öðru en eingöngu erfðaeiturhrifum þar eð eiturhrif í markvef geta einnig valdið því að DNA-færsla eykst (12. og 41. heimild). Hins vegar sjást lág eða miðlungs frumueiturhrif oft með þekktum efnum með eiturverkun á erfðaefni (12. heimild) sem sýnir að ekki er hægt að greina á milli DNA-færslu af völdum erfðaeiturhrifa og af völdum frumueiturhrifa í halastjörnumælingunni eingöngu. Ef aukning í DNA-færslu kemur í ljós er þó mælt með því að framkvæma rannsókn á einum eða fleiri vísum um frumueiturhrif þar eð það getur hjálpað til við túlkun á niðurstöðunum. Aukning í DNA-færslu, þar sem skýrar vísbendingar um frumueiturhrif eru til staðar, skal túlkuð með varúð.

Margar tillögur um mælingar á frumueiturhrifum hafa verið lagðar fram og þar á meðal teljast vefjameinafræðilegar breytingar viðeigandi mæling á eiturhrifum í vef. Athuganir, s.s. á bólgu, frumuíferð, breytingar á sjálfdrepi eða drepi hafa verið tengdar við aukningu í DNA-færslu; eins og sýnt er fram á í fullgildingarprófun JaCVAM (12. heimild) er þó ekki tiltæk nein endanleg skrá yfir vefjameinafræðilegar breytingar sem eru alltaf tengdar við aukningu í DNA-færslu. Breytingar á klínískum efnafræðimælingum (t.d. AST, ALT) geta einnig veitt gagnlegar upplýsingar um vefjaskemmdir og einnig má athuga viðbótarvísa, s.s. kaspasavirkjun (e. *caspase activation*), TUNEL-litun og Annexin V-litun. Þó eru birt gögn um notkun þess síðarnefnda í rannsóknum í lífi takmörkuð og sum kunna að vera óáreiðanlegri en önnur.

Broddgeltir (eða ský, draugafrumur) eru frumur sem sýna lítið eða ekkert höfuð og stóran útbreiddan hala á smásjármynd og eru taldar vera mjög skemmdar frumur þótt orsakafræði broddgalta sé ótraust (sjá 3. viðbæti). Mælingar með myndgreiningu á hundraðshluta DNA í hala broddgalta eru óáreiðanlegar vegna útlits þeirra og því skulu broddgeltir metnir hver fyrir sig. Veita skal tilvist broddgalta athygli og greina frá henni og öll aukning sem skiptir máli, sem er talin vera af völdum prófunaríðefnisins, skal rannsökuð og túlkuð með varúð. Þekking á hugsanlegum verkunarhætti prófunaríðefna getur hjálpað til við slíkar athuganir.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Dýrið er tilraunaeiningin og því skal bæði leggja fram gögn um hvert dýr og samanteknar niðurstöður í töfluformi. Vegna stigskipts eðlis gagnanna er mælt með því að ákvarða miðgildi hundraðshluta af DNA í hala fyrir hvert sýnisgler og reikna út meðaltal miðgilda fyrir hvert dýr (12. heimild). Meðaltal miðgilda fyrir hvert dýr er síðan ákvarðað til að fá hópmeðaltal. Öll þessi gildi skulu koma fram í skýrslunni. Hægt er að nota aðrar aðferðir (sjá 53. lið) ef fyrir því eru vísindaleg og tölfræðileg rök. Hægt er að beita tölfræðilegri greiningu með ýmsum aðferðum (58.–61. heimild). Við val á tölfræðiaðferð skal taka tillit til þarfar til að umbreyta gögnum (t.d. logri eða kvaðratrót) og/eða til að bæta lágri tölu (t.d. 0,001) við öll gildi (jafnvel yfir núlli) til að milda áhrif af dálkum með núllgildum, eins og fjallað er um í framangreindum tilvísunum. Nánari upplýsingar um greiningu á samverkan meðferðar og kyns, þegar bæði kynin eru notuð, og frekari greiningar á gögnum, hvort sem munur finnst eða ekki, er að finna í 2. viðbæti. Einnig skal greina frá gögnum um eiturhrif og klínísk einkenni.

Viðmiðanir fyrir ásættanleika

Samþykki fyrir prófun byggist á eftirfarandi viðmiðunum:

a) Samskeiða neikvæði samanburðurinn er talinn ásættanleg viðbót við rannsóknarsögulegan gagnagrunn rannsóknarstofunnar um neikvæðan samanburð, eins og lýst er í 16. lið.

b) Samskeiða jákvæðir samanburðir (sjá 29. lið) skulu vekja svaranir sem eru sambærilegar við þær sem er aflað í rannsóknarsögulega gagnagrunninum um jákvæðan samanburð og valda tölfræðilega marktækri aukningu miðað við samskeiða neikvæða samanburðinn.

c) Nægilegur fjöldi frumna og skammta hefur verið greindur (52. og 36.–38. liður).

d) Viðmiðanir fyrir vali á hæsta skammti eru í samræmi við þær sem lýst er í 36. lið.

Mat og túlkun á niðurstöðum

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri jákvæðri svörun ef:

a) að minnsta kosti einn prófunarskammtanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) aukningin er skammtatengd í mati með viðeigandi leitniprófun,

c) einhver niðurstaðnanna lendir utan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði fyrir tilteknar tegundir, burðarefni, íkomuleiðir, vefi og inngjafafjölda.

Ef allar þessar viðmiðanir eru uppfylltar er litið svo á að prófunaríðefnið geti vakið rof DNA-þátta í vefjum sem rannsakaðir eru í þessu prófunarkerfi. Ef eingöngu ein eða tvær þessara viðmiðana eru uppfylltar, sjá 62. lið.

Að því tilskildu að farið sé að öllum viðmiðunum fyrir ásættanleika er prófunaríðefnið talið valda greinilegri neikvæðri svörun ef:

a) enginn prófunarstyrkleikanna sýnir tölfræðilega marktæka aukningu í samanburði við samskeiða neikvæða samanburðinn,

b) það er engin skammtatengd aukning í mati með viðeigandi leitniprófun,

c) allar niðurstöðurnar lenda innan dreifingarinnar í rannsóknarsögulegum gögnum um neikvæða samanburði fyrir tilteknar tegundir, burðarefni, íkomuleiðir, vefi og inngjafafjölda.

d) sýnt hefur verið fram á beinar eða óbeinar vísbendingar sem styðja váhrif af eða eiturhrif á markvefinn eða markvefina.

Þá er litið svo á að prófunaríðefnið geti ekki vakið rof DNA-þátta í vefjum sem rannsakaðir eru í þessu prófunarkerfi.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri eða neikvæðri svörun.

Ef svörunin er hvorki greinilega neikvæð né greinilega jákvæð (þ.e. viðmiðanirnar í 59. eða 60. lið eru ekki allar uppfylltar) og til að auðvelda ákvörðun á líffræðilegu mikilvægi niðurstöðu skulu gögnin metin samkvæmt sérfræðiáliti og/eða frekari rannsóknir gerðar, ef fyrir því eru vísindaleg rök. Það getur verið gagnlegt að telja viðbótarfrumur (eftir því sem við á) eða gera endurtekna tilraun, mögulega með því að nota bestu tilraunaskilyrði (t.d. bil milli skammtastærða, aðrar íkomuleiðir, aðra sýnatökutíma eða aðra vefi).

Í örfáum tilvikum gefa gögnin ekki kost á ályktunum um jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður, jafnvel eftir frekari rannsóknir, og því er ályktað að þær séu tvíræðar.

Til að meta líffræðilegt mikilvægi jákvæðrar eða tvíræðrar niðurstöðu er gerð krafa um upplýsingar varðandi frumueiturhrif á markvefinn (sjá 54.–55. lið). Ef jákvæðar eða tvíræðar niðurstöður finnast eingöngu þar sem eru skýrar vísbendingar um frumueiturhrif skal ályktа að rannsóknin sé tvíræð varðandi frumueiturhrif nema nægar upplýsingar liggi fyrir sem styðja endanlega niðurstöðu. Ef rannsóknarniðurstaða er neikvæð þar sem merki eru um eiturhrif í öllum prófuðum skömmtum er ráðlegt að gera frekari rannsóknir á skömmtum sem eru ekki eitraðir.

Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni:

— uppruni, lotunúmer, ef það liggur fyrir

— stöðugleiki prófunaríðefnisins, síðasti notkunardagur eða dagsetning endurgreiningar, ef hún er þekkt.

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunaríðefnisins í leysinum/burðarefninu, ef þau liggja fyrir

— tilreiðsla skammtasamsetninga,

— magngreiningar eða samsetningar (t.d. stöðugleiki, einsleitni, nafnstyrkur).

Tilraunadýr:

— tegundir/stofn sem eru notuð og vísindalegur og siðferðilegur rökstuðningur fyrir því vali,

— fjöldi, aldur og kyn dýra,

— uppruni, aðbúnaður, fóður, fjölbreytni o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf og lok prófunar, þ.m.t. dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— gögn um jákvæðan og neikvæðan samanburð (burðarefni/leysir),

— niðurstöður úr skammtastærðarrannsókninni (hafi hún verið gerð),

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— upplýsingar um tilreiðslu prófunaríðefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunaríðefnið er gefið,

— rökstuðningur fyrir vali á íkomuleið,

— innsprautunarstaður (fyrir rannsóknir undir húð eða í bláæð),

— aðferðir við undirbúning sýnis, vefjameinafræðilegar greiningar ef þær eru tiltækar, einkum fyrir íðefni sem gefur jákvæða svörun í halastjörnumælingu,

— rök fyrir vali á vef,

— aðferðir við að staðfesta að prófunaríðefnið hafi náð til markvefjanna, eða komist í almenna hringrás, ef neikvæðar niðurstöður fást,

— raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar/dag) reiknuð út frá styrkleika prófunaríðefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni og út frá neyslu, ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— nákvæm lýsing á meðferð og sýnatökuáætlunum og rökstuðningur fyrir valinu (t.d. gögn um eiturefnahvörf ef þau eru tiltæk),

— aðferð við að lina sársauka, verkjastilling,

— aðferð við aflífun,

— verklag við einangrun og varðveislu vefja,

— aðferð við tilreiðslu sviflausnar með stökum frumum/kjörnum,

— uppruni og lotunúmer allra hvarfmiðla (ef unnt er),

— aðferðir við mat á frumueiturhrifum,

— skilyrði við rafdrátt,

— tækni sem er notuð við litun og

— aðferðir við talningu og mælingu á halastjörnum.

Niðurstöður:

— almennar klínískar athuganir, ef einhverjar eru, áður en prófunartímabilið hefst og á meðan því stendur fyrir hvert dýr,

— vísbendingar um frumueiturhrif, ef við á,

— að því er varðar rannsóknir sem standa lengur en eina viku: líkamsþyngd hvers dýrs meðan rannsókn stendur yfir, þ.m.t. dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik fyrir hvern hóp; fóðurát,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef þau koma í ljós,

— fyrir hvern vef/hvert dýr: hundraðshluti DNA í hala (eða aðrar mælingar, verði þær fyrir valinu) og miðgildi fyrir hvert sýnisgler, meðalgildi fyrir hvert dýr og meðalgildi fyrir hvern hóp,

— samhliða og rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á breytusviðum, meðaltölum/miðgildum og staðalfrávikum fyrir hvern vef sem er metinn,

— gögn um samskeiða, jákvæðan samanburð og rannsóknarsögulegan, jákvæðan samanburð,

— skammtasvörunarferill þar sem jákvæður samanburður er notaður, fyrir annan vef en lifur. Hann getur komið úr gögnum sem er safnað meðan sýnt er fram á hæfni (sjá 16. og 17. lið) og þeim skal fylgja rökstuðningur, með vísun í nýjustu heimildir, sem sýnir fram á viðeigandi umfang og útbreiðslu svörunar í þeim vef,

— tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar og viðmiðanir til að meta hvort svörun sé jákvæð, neikvæð eða tvíræð,

— tíðni broddgalta í hverjum hóp og í hverju dýri.

Umfjöllun um niðurstöðurnar

Niðurstaða

Tilvísanir

HEIMILDIR:

1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline*in vivo*Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

50) Kafli B.8 í þessum viðauka: *Meðalbráð eiturhrif við innöndun: 28 daga rannsókn.*

51) Kafli B.29 í þessum viðauka: *Hálflangvinn eiturhrif við innöndun: 90 daga rannsókn.*

52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.'

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR:

Rafdráttur stakra frumna á geli við basísk skilyrði: Næm tækni til greiningar á skemmdum vegna frumbreytinga á DNA í hverri frumu/kjarna fyrir sig.

Íðefni: Efni eða blanda.

Halastjarna: Sú lögun sem kjarnasvæði taka á sig eftir að þau hafa farið í gegnum rafdráttarsvið, vegna þess að lögunin líkist halastjörnum: höfuðið er kjarninn og halinn er samsettur af DNA-inu sem færist út úr kjarnanum á rafsviðinu.

Mikilvæg breyta/þáttur: Þetta er breyta í aðferðarlýsingu en lítil breyting á henni getur haft mikil áhrif á ályktanir sem dregnar eru af mælingunni. Mikilvægar breytur geta verið vefsértækar. Ekki skal breyta mikilvægum breytum, sérstaklega ekki innan prófunar, án þess að hugað sé að því hvaða áhrif breytingin hefur á svörun í mælingunni, t.d. eins og umfang og breytileiki í jákvæðum og neikvæðum samanburðum gefa til kynna. Í prófunarskýrslunni skal tilgreina breytingar á mikilvægum breytum meðan á prófuninni stendur eða í samanburði við stöðluðu aðferðarlýsinguna fyrir rannsóknarstofuna og veita rökstuðning fyrir hverri breytingu.

Styrkur hala eða hundraðshluti DNA í hala: Þetta samsvarar styrk halastjörnuhalans í hlutfalli við heildarstyrk (höfuð + hali). Þetta endurspeglar hversu mikið DNA-rofið er, gefið upp sem hundraðshluti.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

———

2. viðbætir

ÞÁTTBUNDIN TILHÖGUN TIL AÐ GREINA KYNJAMISMUN Í HALASTJÖRNUMÆLINGUNNI Í LÍFI

Þáttbundin tilhögun og greining hennar

Í þessari tilhögun eru a.m.k. 5 karldýr og 5 kvendýr prófuð við hvern styrk sem leiðir til þess að í þessari tilhögun eru notuð a.m.k. 40 dýr (20 karldýr og 20 kvendýr, ásamt viðeigandi jákvæðum samanburði).

Tilhögunin, sem er með einfaldari þáttbundnum tilhögunum, er jafngild tvíhliða dreifnigreiningu þar sem kyn og styrkgildi eru aðaláhrifin. Hægt er að greina gögnin með því að nota margs konar, staðlaða tölfræðihugbúnaðarpakka s.s. SPSS, SAS, STATA og Genstat ásamt því að nota R.

Greiningin skiptir breytileikanum í gagnamenginu milli kynja, styrkleika og verkunar milli kynjanna og styrkleikanna. Hver skilyrði eru prófuð með samanburði við áætlun á breytileika milli samanburðardýranna innan dýrahópa af sama kyni sem fá sama styrk. Allar upplýsingar um undirliggjandi aðferðafræði eru aðgengilegar í mörgum stöðluðum tölfræðikennslubókum (sjá tilvísanir) og í hjálparbúnaðinum sem fylgir tölfræðipökkunum.

Greiningunni er haldið áfram með því að skoða verkun kyns x styrks í dreifnigreiningartöflunni (ANOVA) ([1]). Sé marktæk verkun ekki til staðar gefa samanlögð gildi fyrir bæði kyn eða öll styrkleikastig gildar tölfræðilegar prófanir milli gilda sem grundvallast á hópuðum breytileika innan hóps samkvæmt dreifnigreiningunni.

Greiningunni er haldið áfram með því að skipta áætluðum breytileika milli styrkleika í samanburðarföll sem gera það kleift að prófa fyrir línulegum samanburðarföllum og annars stigs samanburðarföllum í svörunum fyrir öll styrkleikastig. Ef marktæk verkun er til staðar milli kyns x styrks er einnig hægt að skipta þessari verkun í línuleg samanburðarföll x kyn og annars stigs samanburðarföll x kyn. Með þessu er hægt að prófa hvort styrksvörunin sé samsvarandi fyrir bæði kynin eða hvort það sé munur á svörun milli kynjanna.

Hægt er að nota áætlaðan, hópaðan breytileika innan hóps til að gera paraðar prófanir á mismuninum milli meðaltala. Hægt er að gera þennan samanburð milli meðaltala fyrir bæði kynin og milli meðaltala fyrir mismunandi styrkleikastig, s.s. fyrir samanburð við neikvæð samanburðargildi. Í þeim tilvikum þar sem er marktæk virkni er hægt að gera samanburð á meðaltölum mismunandi styrkleika fyrir sama kyn eða á meðaltölum fyrir bæði kynin við sama styrk.

Tilvísanir

Fjallað er um kenninguna, tilhögunina, aðferðafræðina, greininguna og túlkunina á þáttbundnum tilhögunum í mörgum tölfræðikennslubókum, allt frá einföldustu tveggja þátta greiningu til flóknari forma sem eru notuð í aðferðafræði við tilhögun tilrauna. Eftirfarandi listi er ekki tæmandi. Í sumum bókum eru útreiknuð dæmi sambærilegrar tilhögunar, í sumum tilvikum með kóða til að keyra greininguna með aðstoð ýmissa hugbúnaðarpakka.

1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

([1]) Tölfræðingar sem velja líkansaðferðir, s.s. almenn línuleg líkön (e. *General Linear Models* (GLM)), geta notað aðra en sambærilega aðferð við greininguna en þurfa þó ekki endilega að leiða út hefðbundna dreifnigreiningartöflu sem byggir á algrímskri aðferð (e. *algorithmic approach*) til að reikna út tölfræðilegar upplýsingar áður en tölvur komu til sögunnar.

4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

———

3. viðbætir

NÚVERANDI TAKMARKANIR GREININGARINNAR

Vegna núverandi stöðu þekkingar tengjast nokkrar takmarkanir halastjörnumælingunni í lífi. Búast má við að þessum takmörkunum fækki eða að þær verði skilgreindar þrengra þegar meiri reynsla er komin á notkun greiningarinnar til að svara spurningum um öryggismál í lagalegu samhengi.

1. Sumar tegundir DNA-skemmda kunna að vara stutt, þ.e. viðgerð á sér stað of fljótt til að hægt sé að finna þær 24 klst. eða meira eftir síðasta skammt. Ekki er til sanngreinanlegur listi yfir þær tegundir skammlífra skemmda né heldur yfir íðefni sem teljast líkleg til að valda þess háttar skemmdum og ekki er vitað á hvaða tímabili er hægt að greina þessa tegund skemmda. Besti sýnatökutíminn, eða sýnatökutímarnir, geta líka verið íðefna- eða íkomuleiðarsértækir og sýnatökutímar skulu ákvarðaðir út frá gögnum um hraðafræði (t.d. við tímann (T_{max}) sem er toppurinn sem styrkurinn nær í blóðvökva eða vefjum), ef þau eru tiltæk. Í flestum fullgildingarrannsóknum sem styðja þessa prófunaraðferð er tilgreint að krufning skuli fara fram 2 eða 3 klst. eftir að síðasti skammturinn hefur verið gefinn. Í flestum rannsóknum í birtum skrifum er því lýst að lokaskammturinn sé gefinn 2 til 6 klst. fyrir aflífun. Þessi reynsla var því notuð sem grundvöllur að tilmælunum í prófunaraðferðinni um að lokaskammturinn skuli gefinn á tilteknum tímapunkti 2 til 6 klst. fyrir krufningu, ef engar upplýsingar liggja fyrir um annað.

2. Ekki finnast nein rannsóknargögn um rannsókn á næmi prófunarinnar til greiningar á skammlífum DNA-skemmdum í kjölfar gjafar í fóðri eða drykkjarvatni, samanborið við gjöf með magaslöngu. DNA-skemmdir hafa fundist í kjölfar gjafar í fóðri og drykkjarvatni en skýrslur um slíkt eru tiltölulega fáar í samanburði við þá miklu reynslu sem fengist hefur með gjöf með magaslöngu og með innsprautun í kviðarhol. Því getur næmi greiningarinnar verið minna m.t.t. íðefna sem valda skammlífum skemmdum þegar þau eru gefin í fóðri eða drykkjarvatni.

3. Engar fjölsetrarannsóknir hafa verið gerðar á öðrum vefjum en lifur og maga og því hafa ekki verið settar fram ráðleggingar um hvernig á að ná fram næmum og samanburðarnákvæmum svörunum í öðrum vef en lifur, t.d. eins og búist er við fyrir svið jákvæðs og neikvæðs samanburðar. Ekki var heldur unnt að komast að samkomulagi um að setja lægri mörk fyrir gildi neikvæðs samanburðar að því er varðar lifur.

4. Þó að sýnt sé fram á truflandi áhrif frumueiturhrifa í glasi í nokkrum útgefnum ritum hafa fá gögn verið birt varðandi frumueiturhrif í lífi og því var ekki hægt að mæla með neinni tiltekinni mælingu á frumueiturhrifum. Vefjameinafræðilegar breytingar, s.s. bólga, frumuíferð, breytingar með sjálfdrepi eða drepi, hafa verið tengdar við aukningu í DNA-færslu en eins og sýnt er fram á í fullgildingarprófun JaCVAM (OECD, 2014) leiða þessar breytingar ekki alltaf til jákvæðra niðurstaðna í halastjörnumælingu og af þeim sökum er ekki tiltæk nein endanleg skrá yfir vefjameinafræðilegar breytingar sem eru alltaf tengdar við aukningu í DNA-færslu. Áður hefur verið stungið upp á því að broddgeltir (eða ský, draugafrumur) séu vísbending um frumueiturhrif en orsakafræði broddgalta er þó ótraust. Til eru gögn þar sem lagt er til að þeir geti orsakast af íðefnatengdum frumueiturhrifum, aflrænum skemmdum/skemmdum af völdum ensíms sem hefjast við undirbúning sýnis (Guerard *et al.*, 2014) og/eða bráðari áhrifum af erfðaeiturhrifum prófunaríðefnisins. Önnur gögn virðast sýna fram á að þeir séu tilkomnir vegna meiriháttar DNA-skemmda sem er hugsanlega hægt að gera við (Lorenzo *et al.*, 2013).

5. Vefir eða frumukjarnar hafa verið frystir með góðum árangri til síðari greiningar. Þetta leiðir yfirleitt til mælanlegra áhrifa á svörunina við burðarefninu og jákvæða samanburðinum (Recio et al., 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Ef frysting er notuð skal rannsóknarstofan sýna fram á hæfni í aðferðum við hana og staðfesta viðunandi lágt magn hundraðshluta DNA í hala í markvefjum dýra, sem hafa fengið burðarefnið, og að enn sé hægt að greina jákvæða svörun. Heimildir innihalda lýsingu á mismunandi aðferðum við frystingu á vef. Sem stendur er þó ekki samkomulag um hvernig best sé að frysta og þíða vefi og hvernig skuli meta hvort hugsanlega breytt svörun geti haft áhrif á næmi prófunarinnar.

6. Nýlegt starf hefur þó sýnt fram á að þess megi vænta að skráin yfir mikilvægar breytur haldi áfram að styttast og mæliþættirnir fyrir mikilvægar breytur verði skilgreindir af meiri nákvæmni (Guerard *et al.*, 2014).

Tilvísanir

1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

———

16) Í stað kafla C.13 í C-hluta komi eftirfarandi:

„C.13 **Uppsöfnun í fiski: Vatns- og fæðutengd váhrif**

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 305 um prófanir (2012). Meginmarkmið þessarar endurskoðunar á prófunaraðferðinni er tvíþætt. Í fyrsta lagi er henni ætlað að fella inn prófun á fæðutengdri uppsöfnun í lífverum ([1]) sem er hentugt til að ákvarða uppsöfnunargetu efna með mjög litla vatnsleysni. Í öðru lagi er henni ætlað að skapa prófunaraðferð þar sem notaðir eru færri fiskar, eftir því sem við á, af ástæðum er varða velferð dýra og sem er kostnaðarhagkvæmari.

Á árunum eftir að samsteypta prófunaraðferðin C.13 (1. heimild) var samþykkt hafa fjölmörg efni verið prófuð og umtalsverð reynsla fengist, bæði hjá rannsóknarstofum og eftirlitsyfirvöldum. Þetta hefur leitt til þeirrar vissu að hægt sé að draga úr flækjustigi prófunarinnar ef sértækar viðmiðanir eru uppfylltar (sjá 88. lið) og að stigskipt aðferð sé möguleg. Reynslan hefur einnig sýnt að líffræðilegir þættir, s.s. vöxtur og fituefnainnihald fiska, geti haft sterk áhrif á niðurstöður og e.t.v. þurfi að taka tillit til þeirra. Einnig hefur verið viðurkennt að prófun á efnum sem eru mjög torleysanleg í vatni sé e.t.v. ekki tæknilega möguleg. Að því er varðar efni með mjög litla vatnsleysni í vatnsumhverfinu getur mikilvægi váhrifa með vatni þar að auki verið takmarkað í samanburði við fæðutengda leið. Þetta leiddi til þess að þróuð var prófunaraðferð þar sem fiskar verða fyrir váhrifum með fóðrinu (sjá 7.–14. lið og 97. lið og áfram). Fullgilding (hringprófun) prófunar á fæðutengdum váhrifum fór fram á árinu 2010 (51. heimild).

Helstu breytingar eru eftirfarandi:

— Prófun á einungis einum prófunarstyrk getur talist fullnægjandi ef líklegt er að lífþéttnistuðullinn (BCF) sé óháður prófunarstyrknum.

— Smækkuð tilhögun prófunar á vatnstengdum váhrifum með færri sýnatökupunktum er möguleg, ef sértækar viðmiðanir eru uppfylltar.

([1]) Sjá skilgreiningar og einingar í 1. viðbæti.

— Fituefnainnihald fiska skal mælt þannig að hægt sé að gefa lífþéttnistuðull (BCF) upp á grundvelli 5% fituefnainnihalds.

— Meiri áhersla er á mat á lífþéttnihraðastuðli (þegar unnt er) á eftir því að meta lífþéttnistuðul við stöðugt ástand.

— Að því er varðar tiltekna efnaflokka verður lagt til að gerð verði prófun á fæðutengdum váhrifum þegar það er talið henta betur en prófun á vatnstengdum váhrifum.

— Vega skal þyngd fiska þannig að hægt sé að leiðrétta lífþéttnihraðastuðulinn (BCF_k) m.t.t. þynningar vegna vaxtar (e. *growth dilution*).

Áður en nokkur prófun á uppsöfnun í lífverum er gerð skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið vera þekktar:

a) Næmi greiningartækninnar til að mæla vef og styrk bæði prófunarefnis og hugsanlegra umbrotsefna í vatni eða fæðu (sjá 65. lið).

b) Vatnsleysni [prófunaraðferð A.6; (2. heimild)]; hún skal ákvörðuð í samræmi við aðferð sem hentar fyrir (áætlað) svið leysni til að fá fram áreiðanlegt gildi. Að því er varðar vatnsfælin efni verður alla jafna um súluskolunaraðferð að ræða.

c) Deilistuðull n-oktanóls og vatns, K_{OW} ([1]) [prófunaraðferðir A.8 (4. heimild), A.24 (5. heimild), A.23 (6. heimild)], eða aðrar viðeigandi upplýsingar um hegðun við skiptingu (t.d. sog á fituefni, K_{OC}); þetta skal ákvarðað í samræmi við aðferð sem hentar fyrir (áætlað) svið K_{OW} til að fá fram áreiðanleg gildi. Að því er varðar vatnsfælin efni verður alla jafna um hæghrærsluaðferð að ræða [prófunaraðferð A.23 (6. heimild)].

d) Stöðugleiki efnis í vatni (vatnsrof [prófunaraðferð C.7 (7. heimild)]).

e) Stöðugleiki efnis í fæðu (einkum þegar valin er prófun á fæðutengdum váhrifum).

f) Upplýsingar um ljósummyndun sem skipta máli fyrir ágeislunarskilyrði í prófuninni (8. heimild).

g) Yfirborðsspenna (þ.e. fyrir efni þar sem ekki er unnt að ákvarða log K_{OW}) [prófunaraðferð A.5 (9. heimild)].

h) Gufuþrýstingur [prófunaraðferð A.4 (10. heimild)].

i) Hvers kyns upplýsingar um niðurbrot í vatni, sem á sér stað fyrir tilstilli lífvera eða án tilstillis lífvera, s.s. (en takmarkast ekki við) auðlífbrjótanleika [prófunaraðferðir C.4, II. til VII. hluti (11. heimild), og C.29 (12. heimild)], eftir því sem við á.

j) Upplýsingar um umbrotsefni: uppbygging, log K_{OW}, myndun og niðurbrjótanleiki, eftir því sem við á.

k) Klofnunarfasti sýru (pK_a) fyrir efni sem gætu jónast. Ef nauðsyn krefur skal aðlaga sýrustig prófunarvatnsins til að tryggja að efnið sé í ójónuðu formi í prófuninni ef slíkt er samrýmanlegt við fisktegundirnar.

Óháð váhrifaaðferð eða sýnatökuáætlun sem er valin lýsir þessi prófunaraðferð tilhögun við að lýsa uppsöfnunarmætti efna í fiski. Þótt gegnumstreymisprófanir séu æskilegastar er heimilt að nota hálfkyrrstöðuprófanir að því tilskildu að þær uppfylli gildisviðmiðanirnar (sjá 24. og 113. lið). Í fæðutengdri váhrifaleið er gegnumstreymiskerfi ekki nauðsynlegt til að viðhalda styrk prófaðs efnis í vatni en það stuðlar að því að viðhalda fullnægjandi styrk uppleysts súrefnis og hjálpar til við að tryggja hreint vatn og fjarlægja áhrif af t.d. úrgangsefnum.

([1]) Stundum táknað með P_{OW}; ákvarðað með hristiflöskuaðferð í prófunaraðferð A.8 (4. heimild), háþrýstivökvaskiljunaraðferð í prófunaraðferð A.24 (5. heimild) og hæghrærsluaðferð í prófunaraðferð A.23 (6. heimild). Sytursúlutæknin er notuð af og til í því skyni að ákvarða log K_{OW}. Takmarkaður fjöldi rannsókna er tiltækur þar sem þessi tækni er notuð, fyrst og fremst fyrir klóruð bífenýl og díbensódíoxín (t.d. Li og Doucette, 1993) (3. heimild). Að því er varðar efni sem gætu jónast skal log K_{OW} eiga við um ójónað form.

Óháð prófunaraðferðinni sem er valin eru nægar upplýsingar gefnar í þessari prófunaraðferð til að hægt sé að framkvæma prófunina en jafnframt er svigrúm fyrir aðlögun á tilraunatilhöguninni með hliðsjón af skilyrðum á tilteknum rannsóknarstofum og mismunandi eiginleikum prófunarefna. Prófun á vatnstengdum váhrifum hentar best fyrir stöðug, lífræn efni með log K_{OW}-gildi á bilinu 1,5 og 6,0 (13. heimild) en hana má einnig nota fyrir mjög vatnsfælin efni (með log K_{OW} > 6,0) ef hægt er að sýna fram á stöðugan og að fullu uppleystan styrk prófunarefnisins í vatni. Ef ekki er hægt að sýna fram á stöðugan styrk prófunarefnisins í vatni þá er rannsókn með vatni ekki viðeigandi og því þyrfti fæðutengdu aðferðina til að prófa efnið í fiskum (þó að túlkun og notkun á niðurstöðum úr fæðutengdri prófun geti oltið á reglurammanum). Áætla má lífþéttnistuðul (BCF, stundum táknaður K_B) fyrir fram með jöfnu Bintein o.fl. (14. heimild) fyrir lífræn efni með log K_{OW}-gildi allt að 9,0. Áætlun fyrir fram á lífþéttnistuðli fyrir mjög vatnsfælin efni getur verið hærri en það gildi lífþéttnistuðuls fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}), sem vænta má að fáist við tilraunir á rannsóknarstofu, einkum ef hann er áætlaður fyrir fram með því að nota einfalt línulegt líkan. Mæliþættir sem einkenna getu til uppsöfnunar í lífverum eru m.a. fasti fyrir upptökuhraða (k_1), fastar fyrir hraða taps, þ.m.t. hreinsunarhraðafasti (k_2), lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}), stuðull fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) og fæðutengdur lífmögnunarstuðull (BMF) ([1]).

Notkun geislamerktra prófunarefna getur auðveldað greiningu vatns-, fóður- og fisksýna og þau er hægt að nota til að ákvarða hvort sanngreining og mæling á umbrotsefnum sé nauðsynleg. Ef geislavirkar heildarleifar eru mældar einar og sér (t.d. með bruna eða með því að leysa upp vef) byggist lífþéttnistuðullinn (BCF) eða lífmögnunarstuðullinn (BMF) á móðurefninu í heild sinni, öllum umbrotsefnum sem eftir eru og einnig uppteknu kolefni. Því er e.t.v. ekki hægt að bera gildi lífþéttnistuðuls (BCF) eða lífmögnunarstuðuls (BMF), sem byggjast á geislavirkum heildarleifum, beint saman við lífþéttnistuðul (BCF) eða lífmögnunarstuðul (BMF) sem fæst með sértækri efnagreiningu á móðurefninu einu. Við rannsóknir með geislamerktum efnum er hægt að beita aðskilnaðaraðferðum, s.s. þunnlagsskiljun, háþrýstivökvaskiljun eða gasgreiningu ([2]), fyrir greiningu til að ákvarða lífþéttnistuðul (BCF) eða lífmögnunarstuðul (BMF) sem byggist á móðurefninu. Ef aðskilnaðaraðferðum er beitt skal framkvæma sanngreiningu og magnákvörðun á móðurefninu og viðeigandi umbrotsefnum ([3]) (sjá 65. lið) ef lífþéttnistuðull (BCF) eða lífmögnunarstuðull (BMF) eiga að byggjast á styrk móðurefnis í fiski en ekki á geislamerktum heildarleifum. Einnig er mögulegt að sameina rannsókn á efnaskiptum í fiski eða rannsókn í lífi á dreifingu og rannsókn á uppsöfnun í lífverum með greiningu og sanngreiningu leifa í vefjum. Hægt er að spá fyrir um möguleika á efnaskiptum með hentugum verkfærum (t.d. QSAR-verkfærakistu Efnahags- og framfarastofnunarinnar (e. *OECD QSAR toolbox*) (15. heimild) og QSAR-áætlunum sem njóta einkaleyfisverndar).

Ákvörðun um það hvort eigi að gera prófun á vatns- eða fæðutengdum váhrifum, og í hvaða uppsetningu, skal byggjast á þáttunum í 3. lið ásamt viðeigandi regluramma. Til dæmis skal byrja á að íhuga prófun á vatnstengdum váhrifum ef um er að ræða efni sem eru með hátt log K_{OW} sem sýnir samt greinanlega vatnsleysni að því er varðar næmi tiltækrar greiningartækni. Þó er mögulegt að upplýsingar um vatnsleysni séu ekki endanlegar fyrir þessar vatnsfælnu tegundir efna þannig að sá möguleiki að tilreiða stöðugan, mælanlegan, uppleystan styrk í vatni (stöðugarýrulausnir eru ekki leyfðar), fyrir rannsókn á vatnstengdum váhrifum, skal kannaður áður en tekin er ákvörðun um það hvaða prófunaraðferð eigi að nota (16. heimild). Ekki er unnt að gefa nákvæmar forskriftarleiðbeiningar um þá aðferð sem á að nota, byggt á vatnsleysni og viðmiðunum um þröskuldsgildi deilistuðuls oktanóls og vatns, þar eð aðrir þættir (greiningartækni, niðurbrot, ásog o.s.frv.) geta haft merkjanleg áhrif á nothæfi aðferðar af þeim ástæðum sem gefnar eru hér að framan. Efni með log K_{OW} hærri en 5 og vatnsleysni undir ~ 0,01–0,1 mg/l eru þó til marks um svið efna sem getur orðið sífellt erfiðara að gera á prófun með vatnstengdum váhrifum.

Íhuga skal aðra þætti, sem geta haft áhrif á val á prófun, þ.m.t. geta efnisins til að ásogast á prófunarílát og -búnað, stöðugleiki þess í vatnslausn á móti stöðugleika þess í fiskafóðri (17. og 18. heimild) o.s.frv.

([1]) Sjá skilgreiningar og einingar í 1. viðbæti.
([2]) Þunnlagsskiljun (TLC); háþrýstivökvaskiljun (HPLC); gasgreining (GC).
([3]) Í sumum reglurömmum getur greining á umbrotsefnum verið skyldubundin þegar tiltekin skilyrði eru uppfyllt (sjá 65. lið).

Upplýsingar um hagnýta þætti af þessum toga geta legið fyrir úr öðrum framkvæmdum rannsóknum á vatnstengdum váhrifum. Frekari upplýsingar um mat á þáttum sem varða framkvæmd rannsókna á uppsöfnun í lífverum er að finna í heimildum (t.d. 19. heimild).

Að því er varðar efni þar sem leysni eða viðhald styrks í vatni, sem og greining á þessum styrkleikum, hamlar ekki framkvæmd aðferðar með vatnstengdum váhrifum er þessi aðferð ákjósanleg til að ákvarða lífþéttnimátt efnisins. Í öllum tilvikum skal sannprófa að váhrifastyrkleikinn eða -styrkleikarnir í vatni sem nota á sé(u) innan marka m.t.t. vatnsleysni efnisins í prófunarmiðlinum. Hægt er að nota mismunandi aðferðir til að viðhalda stöðugum styrkleikum uppleysta prófunarefnisins, t.d. að nota stofnlausnir eða hlutlaus skömmtunarkerfi (e. *passive dosing system*) (t.d. súluskolunaraðferð), svo fremi að hægt sé að sýna fram á að unnt sé að viðhalda stöðugum styrkleikum og að prófunarmiðillinn breytist ekki frá því sem mælt er með í 27. lið.

Að því er varðar mjög vatnsfælin efni (log K_{OW} > 5 og leysni undir ~ 0,01–0,1 mg/l) getur prófun með vatnstengdum váhrifum orðið sífellt erfiðari. Ástæður fyrir hömlum geta verið þær að ekki sé hægt að viðhalda styrk í vatni við gildi sem telst nægilega stöðugt (t.d. vegna sogs á gler váhrifaíláta eða hraðrar upptöku í fiskana) eða að styrkir í vatni, sem á að nota, eru svo lágir að þeir eru á sama styrkbili og magngreiningarmörk eða lægri ([1]). Mælt er með fæðutengdri prófun fyrir þessi mjög vatnsfælnu efni að því tilskildu að prófunin sé í samræmi við viðeigandi regluramma og þarfir m.t.t. áhættumats.

Að því er varðar yfirborðsvirk efni skal íhuga hvort prófun á lífþéttni við vatnstengd váhrif sé möguleg miðað við eiginleika efnisins, að öðrum kosti hentar fóðurrannsókn að öllum líkindum betur. Yfirborðsvirk efni eru efni sem virka á yfirborðinu og minnka yfirborðsspennu á fasaskilum milli tveggja vökva. Vatns- og fitusækið eðli þeirra (þ.e. þau innihalda bæði vatnssækinn og vatnsfælinn hluta) veldur því að þau safnast saman á skilflötum, s.s. skilfleti vatns og lofts, vatns og fæðu, og glerveggjum sem hamlar ákvörðun á styrk þeirra í vatni.

Í fæðutengdri prófun er hægt að sniðganga hluta af váhrifaþáttunum fyrir flóknar efnablöndur, sem innihalda efnisþætti með mismunandi vatnsleysnimörk, að því leyti að líklegra er að samanburðarhæf váhrif af öllum efnisþáttum blöndunnar náist með þessari aðferð en með aðferð í vatni (sjá 20. heimild).

Tekið skal fram að fæðutengd aðferð gefur fæðutengdan lífmögnunarstuðul (BMF), fremur en lífþéttnistuðul (BCF) ([2]). Til eru aðferðir til að meta stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) út frá gögnum sem fást úr fóðurrannsókn (eins og fjallað er um í 8. viðbæti) en þessar aðferðir skal nota með varúð. Alla jafna er gengið út frá hraðafræði af fyrstu gráðu í þessum aðferðum og þær eiga einungis við um tiltekna flokka efnasambanda. Ólíklegt er að hægt sé að nota slíkar aðferðir á yfirborðsvirk efni (sjá 12. lið).

Einungis skal nota smækkaða uppsetningu prófunar á vatnstengdum váhrifum, með færri sýnatökupunktum til að fækka dýrum og/eða tilföngum (sjá 83. lið og áfram), til að prófa þessi efni ef ástæða er til að ætla að upptaka og hreinsun fylgi u.þ.b. hraðafræði af fyrstu gráðu (þ.e. yfirleitt ójónuð lífræn efni, sjá 88. lið).

([1]) Alla jafna skulu mældir styrkleikar í vatni meðan á upptökufasanum stendur vera a.m.k. tugaþrepi yfir magngreiningarmörkum þannig að hægt sé að mæla fleiri en einn helmingunartíma líkamsálags í hreinsunarfasa rannsóknarinnar.

([2]) Sjá skilgreiningar og einingar í 1. viðbæti.

C.13 – I: **Prófun á lífþéttni í fiskum við vatnstengd váhrif.**

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Prófunin samanstendur af tveimur fösum: váhrifa(upptöku)fasanum og (hreinsunar)fasanum eftir váhrif. Meðan á upptökufasanum stendur er hópur fiska af einni tegund látinn verða fyrir váhrifum af prófunarefninu við einn valinn styrkleika eða fleiri, háð eiginleikum prófunarefnisins (sjá 49. lið). Þeir eru síðan fluttir í miðil sem er laus við prófunarefnið og þá hefst hreinsunarfasinn. Hreinsunarfasi er ávallt nauðsynlegur nema upptaka efnisins í upptökufasanum hafi verið óveruleg. Fylgst er með styrk prófunarefnisins í/á fiskinum (eða tilteknum vefjum hans) í báðum fösum prófunarinnar. Auk váhrifahóps er samanburðarhópur fiska jafnframt hafður við aðstæður sem eru eins nema án prófunarefnisins, til að tengja hugsanleg, skaðleg áhrif sem koma fram í lífþéttniprófuninni við samsvarandi samanburðarhóp og fá fram bakgrunnsstyrk prófunarefnisins ([1]).

Í prófun á vatnstengdum váhrifum er upptökufasinn yfirleitt keyrður í 28 daga. Hægt er að lengja tímann ef nauðsyn krefur (sjá 18. lið) eða stytta hann ef sýnt er fram á að stöðugt ástand hafi náðst fyrr (sjá 1. viðbæti, skilgreiningar og einingar). Út frá jöfnunum í 5. viðbæti má spá fyrir um lengd upptökufasans og hversu langur tími líður þar til stöðugt ástand er komið á. Hreinsunartímabilið hefst síðan þegar fiskurinn verður ekki lengur fyrir váhrifum af prófunarefninu með því að hann er fluttur í hreint ker með sama miðli en án prófunarefnisins. Ef unnt er skal reikna lífþéttnistuðulinn bæði sem hlutfallið milli styrksins í fiskinum (C_f) og vatninu (C_w) við stöðugt ástand (BCF_{SS}, sjá skilgreiningu í 1. viðbæti) og sem stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_K, sjá 1. viðbæti, skilgreiningar og einingar) sem er áætlaður sem hlutfallið á milli hraðafastanna fyrir upptöku (k_1) og hreinsun (k_2) þar sem gengið er út frá hraðafræði af fyrstu gráðu ([2]).

Ef stöðugt ástand næst ekki innan 28 daga er annað hvort reiknaður út lífþéttnistuðull (BCF) með því að nota hraðafræðilega aðferð (sjá 38. lið) eða þá að hægt er að lengja upptökufasann. Ef þetta leiðir til óheppilega langs upptökufasa til að ná stöðugu ástandi (sjá 37. og 38. lið, 5. viðbæti) er hraðafræðileg aðferð ákjósanlegri. Að því er varðar mjög vatnsfælin efni er að öðrum kosti hægt að íhuga að framkvæma fóðurrannsókn ([3]) að því tilskildu að fæðutengd prófun sé í samræmi við viðeigandi regluramma.

Fasti fyrir upptökuhraða, hreinsunar(tap)hraða (eða fleiri en einn fasti, ef önnur flóknari líkön eiga í hlut), lífþéttnistuðullinn (stöðugt ástand og/eða hraðafræðilegur) og, ef unnt er, öryggismörk fyrir hvern og einn þessara þátta eru reiknuð út frá því líkani sem lýsir best mældum styrkleikum prófunarefnisins í fiskinum og vatninu (sjá 5. viðbæti).

Aukning á fiskmassa meðan á prófuninni stendur mun leiða til minnkunar á styrk prófunarefnis í fiskum sem eru að vaxa (svokölluð þynning vegna vaxtar) og af því leiðir að lífþéttnihraðastuðullinn verður vanmetinn ef hann er ekki leiðréttur m.t.t. vaxtar (sjá 72. og 73. lið).

Lífþéttnistuðull byggist á heildarstyrkleika í fiskinum (þ.e. á heildarblautvigt fisksins). Í sérstökum tilvikum má þó nota tiltekna vefi eða líffæri (t.d. vöðva, lifur), ef fiskurinn er nægilega stór, eða skipta má fiskinum í ætan hluta (flak) og óætan hluta (innyfli). Fyrir mörg lífræn efni eru skýr tengsl milli lífþéttnimáttarins og fitusækni efnisins og því eru samsvarandi tengsl milli fituefnainnihalds prófunarfiskanna og mældrar lífþéttni þessara efna. Til að draga úr breytileika af þessum toga í niðurstöðum prófana fyrir mjög fitusækin efni (*þ.e.* með log $K_{OW} > 3$) skal því gefa lífþéttnina upp sem staðlaða samkvæmt fiski með 5% fituefnainnihald (byggt á blautvigt alls skrokksins) til viðbótar við gildið sem fæst beint úr rannsókninni. Þetta er nauðsynlegt til að mynda grunn til að hægt sé að bera saman niðurstöður fyrir mismunandi efni og/eða prófunartegundir. Talan 5% fyrir fituefnainnihald er víða notuð því þetta er meðaltal fituefnainnihalds í fiski sem algengast er að nota í þessari prófunaraðferð (21. heimild).

([1]) Að því er varðar flest prófunarefni er ákjósanlegast að þau greinist ekki í samanburðarvatninu. Bakgrunnsstyrkur ætti einungis að skipta máli varðandi efni sem koma fyrir frá náttúrunnar hendi (t.d. sumir málmar) og efni sem eru alls staðar í umhverfinu.

([2]) Ef augljóst er að hraðafræðin er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (sjá heimildir í 5. viðbæti) og leita ráða hjá líftölfræðingi.

([3]) Upptaka getur takmarkast af litlum váhrifastyrk út af lítilli vatnsleysni í lífþéttniprófuninni en hægt er að ná miklu hærri váhrifastyrk með fæðutengdri prófun.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Til viðbótar við þá eiginleika prófunarefnis sem koma fram í inngangi (3. lið) er nauðsynlegt að hafa upplýsingar um eiturhrif á þær fisktegundir sem á að nota í prófuninni, helst aðfelldan miðgildisbanastyrk (LC_{50}) (þ.e. óháðan tíma) og/eða eiturhrif sem eru metin út frá langtímaprófunum á fiskum (t.d. prófunaraðferðir C.47 (22. heimild), C.15 (23. heimild) og C.14 (24. heimild)).

Viðeigandi greiningaraðferð með þekktri nákvæmni, samkvæmni og næmi til að ákvarða magn efnisins í prófunarlausnunum og í líffræðilega efninu skal vera fyrir hendi ásamt upplýsingum um tilreiðslu og geymslu sýnisins. Einnig skulu magngreiningarmörk prófunarefnisins í bæði vatni og fiskvefjum vera þekkt. Þegar geislamerkt prófunarefni er notað skal það vera með mesta hreinleika sem völ er á (t.d. helst > 98%) og hlutfall geislavirkni sem tengist óhreinindunum skal vera þekkt.

GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

Mismunur á vatnshitastigi er minni en ± 2 °C því mikil frávik geta haft áhrif á líffræðilegar breytur sem skipta máli fyrir upptöku og hreinsun og geta einnig valdið dýrunum streitu.

Styrkur uppleysts súrefnis fer ekki undir 60% mettun.

Styrk prófunarefnisins í kerjunum er viðhaldið innan ± 20% af meðaltali mældra gilda meðan á upptökufasanum stendur.

Styrkur prófunarefnis er undir leysnimörkum þess í vatni, að teknu tilliti til áhrifanna sem prófunarvatnið getur haft á skilvirka leysni ([1]).

Dánartíðni eða önnur skaðleg áhrif/sjúkdómar í bæði samanburðarfiskum og meðhöndluðum fiskum eru undir 10% við lok prófunarinnar; þegar prófunin nær yfir margar vikur eða mánuði skulu dauði og önnur skaðleg áhrif í báðum settunum af fiskum vera undir 5% á mánuði og ekki fara yfir 30% í heild. Marktækur munur á meðaltalsvexti milli prófunarhópa og samanburðarhópa fiska sem sýni er tekið úr gæti bent til eiturhrifa prófunarefnisins.

VIÐMIÐUNAREFNI

Notkun viðmiðunarefna með þekktum lífþéttnimætti og litlu af umbrotsefnum getur, ef með þarf, komið að gagni við eftirlit með tilhögun prófunarinnar (t.d. þegar rannsóknarstofa hefur ekki fyrri reynslu af prófuninni eða ef tilraunaskilyrðum hefur verið breytt).

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

Að því er varðar alla hluta búnaðarins skal forðast að nota efni sem kunna að leysast upp, í- eða ásogast eða útskolast og hafa skaðleg áhrif á fiskana. Hægt er að nota stöðluð rétthyrnd eða sívöl ílát, gerð úr efnafræðilega óvirku efni og af viðeigandi stærð, í samræmi við hleðsluhlutfall (sjá 43. lið). Halda skal notkun mjúkra plaströra í lágmarki. Nota skal pólýtetraflúoretýlen, ryðfrítt stál og/eða glerrör. Að því er varðar prófunarefni með háan ásogsstuðul, s.s. tilbúin pýretróíð, hefur reynslan leitt í ljós að nauðsynlegt getur verið að nota sílanhúðað gler. Í slíkum tilvikum skal fleygja búnaðinum að lokinni notkun. Ákjósanlegt er að láta prófunarkerfin komast í snertingu við þá styrkleika prófunarefnisins sem á að nota í rannsókninni, eins lengi og þörf krefur til að sýna fram á að styrkur váhrifanna breytist ekki meðan á prófun stendur, áður en prófunarlífverunum er bætt við.

([1]) Að því er varðar fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur skal kanna vatnsleysni hvers efnisþáttar sem skiptir máli til að ákvarða viðeigandi váhrifastyrk.

Vatn

Náttúrulegt vatn er að jafnaði notað við prófunina og skal fengið úr ómengaðri uppsprettu með jöfnum gæðum. Þó getur endurgert vatn (þ.e.a.s. steinefnasneytt vatn með sérstökum næringarefnum sem er bætt við í þekktu magni) hentað betur til að tryggja jöfn gæði yfir lengri tíma. Þynningarvatn, sem er vatnið sem er blandað saman við prófunarefnið áður en það er sett í prófunarkerið (sjá 30. lið), skal vera af þeim gæðum að fiskar af völdu tegundinni lifi aðlögunar- og prófunartímabilin af án þess að fram komi nein óeðlileg einkenni í útliti eða atferli. Helst skal vera unnt að sýna fram á að prófunartegundin geti lifað, vaxið og æxlast í þynningarvatninu (t.d. í rannsóknarstofueldi eða prófun á eiturhrifum á lífsferil). Eiginleikum þynningarvatnsins skal lýst, a.m.k. að því er varðar sýrustig, hörku, heildarmagn fastra efna, heildarmagn lífræns kolefnis (TOC ([1])) og helst líka að því er varðar ammóníum, nítrít og basavirkni og seltu ef um sjávartegundir er að ræða. Þeir þættir sem eru mikilvægir til að fiskarnir þrífist vel eru ekki þekktir að fullu en í 2. viðbæti er að finna ráðlagða hámarksstyrkleika ýmissa efnaþátta vegna ferskvatns og sjós.

Gæði þynningarvatns skulu vera stöðug allan prófunartímann. pH-gildið skal vera á bilinu 6,0 til 8,5 við upphaf prófunar en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en ± 0,5 pH-stig. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunarefninu) eða að það hafi ekki skaðleg áhrif á fiskstofninn skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili, a.m.k. við upphaf og lok prófunarinnar. Ákvarðanir skulu gerðar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} og SO_4^{2-}), varnarefnum (t.d. heildarmagni fosfórlífrænna og klórlífrænna varnarefna), heildarmagni lífræns kolefnis og heildarmagni svifagna, t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef sýnt hefur verið fram á að gæði þynningarvatns hafi verið stöðug í a.m.k. eitt ár geta mælingar verið strjálli (t.d. á sex mánaða fresti).

Náttúrlegt innihald agna sem og heildarmagn lífræns kolefnis í þynningarvatninu skal vera eins lítið og unnt er til að forðast ásog prófunarefnisins á lífrænt efni en það gæti skert lífaðgengi þess og þar með leitt til vanmats á lífþéttnistuðlinum. Hámarks viðunandi gildi er 5 mg/l fyrir efnisagnir (þurrefni sem kemst ekki gegnum 0,45 µm síu) og 2 mg/l fyrir heildarmagn lífræns kolefnis (sjá 2.viðbæti). Þynningarvatnið skal síað fyrir notkun, ef nauðsyn krefur. Þeirri hlutdeild lífræns kolefnis í vatninu, sem rekja má til prófunarfiskanna (úrgangsefni) og fæðuleifa, skal haldið eins lágri og mögulegt er (sjá 46. lið).

Prófunarlausnir

Stofnlausn prófunarefnisins er tilreidd í hæfilegum styrk. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið. Annar valkostur, sem gæti átt við í sumum tilvikum, er að nota skömmtunarkerfi með afsogi í fastfasa (e. *solid phase desorption dosing system*). Alla jafna er ekki mælt með notkun á leysum og dreifiefnum (uppleysandi efnum) (sjá 25. lið); þó getur notkun á þessum efnum verið ásættanleg til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika en reyna skal, eftir því sem unnt er, að lágmarka notkun á slíkum efnum og ekki skal fara yfir vendistyrk við myndun hneppa (ef við á). Leyfilegir leysar eru aseton, etanól, metanól, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól; dreifiefni sem hafa verið notuð eru Tween 80, metýlsellulósi 0,01% og HCO-40. Styrkur leysis í endanlegum prófunarmiðli skal vera sá sami í öllum meðhöndlunum (þ.e. án tillits til styrkleika prófunarefnisins) og skal ekki fara yfir samsvarandi eiturhrifaviðmiðunarmörk sem voru ákvörðuð fyrir leysinn við prófunarskilyrðin. Hámarksgildi er styrkur sem nemur 100 mg/l (eða 0,1 ml/l). Ólíklegt er að styrkur leysis sem nemur 100 mg/l valdi verulegum breytingum á hæsta uppleysta styrk prófunarefnis sem hægt er að ná í miðlinum (25. heimild). Hlutdeild leysisins (ásamt prófunarefninu) í heildarinnihaldi lífræns kolefnis í prófunarvatninu skal vera þekkt. Í allri prófuninni skal styrkur heildarmagns lífræns kolefnis í prófunarkerjunum ekki fara meira yfir styrk lífræns kolefnis, sem á upptök sín í prófunarefninu, og leysis eða uppleysandi efnis ([2]), ef slíkt er notað, en sem nemur 10 mg/l (± 20%). Innihald

([1]) Undir heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) fellur lífrænt kolefni úr ögnum og uppleyst, lífrænt kolefni, þ.e.a.s. TOC = POC + DOC.

([2]) Ef leysir eða uppleysandi efni er notað, þó að alla jafna sé ekki mælt með því, skal lífræna kolefninu sem á upptök sín í þessu efni bætt við lífræna kolefnið úr prófunarefninu til að meta styrk lífræns kolefnis í prófunarkerinu.

lífræns efnis getur haft umtalsverð áhrif á magn prófunarefnis sem leysist auðveldlega upp í gegnumstreymisprófunum á fiskum, einkum að því er varðar mjög fitusækin efni. Örútdráttur í fastfasa (e. *solid-phase microextraction*) (sjá 60. lið) getur gefið mikilvægar upplýsingar um hlutfallið milli bundinna efnasambanda og efnasambanda sem leysast auðveldlega upp en gert er ráð fyrir að það síðarnefnda sé sá hluti sem er lífaðgengilegur. Styrkur prófunarefnis skal vera undir leysnimörkum prófunarefnisins í prófunarmiðlinum þrátt fyrir notkun á leysi eða uppleysandi efni. Gæta skal varúðar ef notaðir eru auðlífbrjótanlegir leysar þar eð þeir geta skapað vanda vegna bakteríuvaxtar í gegnumstreymisprófunum. Ef ekki er mögulegt að tilreiða stofnlausn án þess að nota uppleysandi efni skal íhuga hversu viðeigandi rannsókn á vatnstengdum váhrifum er miðað við rannsókn á fæðutengdum váhrifum.

Við gegnumstreymisprófun er nauðsynlegt að nota kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunarefninu og þynnir hana (t.d. skammtadælu, hlutfallsþynningarbúnað, mettunarkerfi) eða skömmtunarkerfi með afsogi í fastfasa til að flytja prófunarstyrkleikana í prófunarkerin. Helst skal skipta a.m.k. fimm sinnum á dag um vökva í hverju prófunarkeri. Gegnumstreymiskerfið er æskilegast en ef ekki er unnt að nota það (t.d. ef það hefur skaðleg áhrif á prófunarlífverur) má nota hálfkyrrstöðutækni, að því tilskildu að gildisviðmiðanir séu uppfylltar (sjá 24. lið). Streymi stofnlausna og þynningarvatns skal athugað 48 klst. fyrir prófun og síðan a.m.k. daglega í prófuninni. Í þessari athugun felst ákvörðun á streyminu í hverju prófunarhólfi og að tryggt sé að frávik í streyminu sé ekki meira en 20% í hverju keri um sig eða milli kerja.

Val á tegund

Mikilvægar viðmiðanir við val á tegund eru að hún sé auðfáanleg, fáist í hæfilegri stærð og auðvelt sé að ala hana í rannsóknarstofunni. Aðrar viðmiðanir við val á fisktegundum eru afþreyingar- eða viðskiptagildi, vistfræðilegt mikilvægi sem og sambærilegt næmi, árangursrík fyrri notkun o.s.frv. Í 3. viðbæti eru tilgreindar prófunartegundir sem mælt er með. Nota má aðrar tegundir en vera má að breyta þurfi tilhögun prófunarinnar svo að prófunarskilyrði verði við hæfi. Færa skal rök fyrir vali tegundarinnar og tilraunaaðferðarinnar í slíkum tilvikum. Alla jafna mun notkun á minni fisktegundum stytta tímann fram að stöðugu ástandi en e.t.v. er þörf á fleiri fiskum (sýnum) til að greina fituefnainnihald og styrk prófunarefnis í fiskunum á fullnægjandi hátt. Auk þess er mögulegt að mismunur á öndunarhraða og efnaskiptum hjá ungum fiskum og eldri fiskum trufli samanburð niðurstaðna milli mismunandi prófana og prófunartegunda. Tekið skal fram að fisktegundir, sem eru prófaðar á (ungfiska) lífsstigi meðan þær vaxa hratt, geta flækt túlkun gagna.

Eldi fiskanna (á við um vatns- og fæðutengd váhrif)

Stofnþýði fiska skal látið aðlagast í vatni í a.m.k. tvær vikur (sjá 28. lið) við prófunarhitastigið og gefið nægilegt fóður allan tímann (sjá 45. lið). Bæði vatn og fóður skal vera af sömu tegund og á að nota í prófuninni.

Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili skal skrá dánartíðni og styðjast við eftirfarandi viðmiðanir:

— Dánartíðni meiri en 10% af þýðinu á sjö dögum: hafna skal allri lotunni.

— Dánartíðni milli 5% og 10% af þýðinu á sjö dögum: aðlögun í sjö daga til viðbótar; ef dánartíðnin er meiri en 5% á næsta sjö daga tímabili: hafna skal allri lotunni.

— Dánartíðni undir 5% af þýðinu á sjö dögum: lotan er ásættanleg.

Fiskar, sem eru notaðir í prófunum, skulu vera lausir við sjáanlega sjúkdóma og afbrigðileika. Henda skal öllum sýktum fiskum. Fiskur má ekki hafa hlotið meðhöndlun gegn sjúkdómi í tvær vikur fyrir prófunina og ekki heldur fá slíka meðhöndlun meðan prófun varir.

FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

Forprófun

Gagnlegt getur verið að framkvæma forprófun til að finna bestu skilyrði í endanlegu prófuninni, t.d. velja mismunandi styrk prófunarefnis eða lengd upptöku- og hreinsunarfasanna, eða til að ákvarða hvort þurfi að framkvæma heildarprófun. Tilhögun forprófunar skal vera þannig að hún fái fram þær upplýsingar sem þarf. Hægt er að íhuga hvort smækkuð prófun geti verið fullnægjandi til að leiða út lífþéttnistuðul eða hvort þörf er á fullnaðarrannsókn (sjá 83.–95. lið varðandi smækkaða prófun).

Váhrifaskilyrði

Lengd upptökufasa

Spá má fyrir um lengd upptökufasans út frá fenginni reynslu (t.d. úr fyrri rannsókn eða uppsöfnunarrannsókn á efni með skylda efnabyggingu) eða með tilteknum reynslutengslum (e. *empirical relationships*) byggðum á þekkingu á annað hvort vatnsleysanleika prófunarefnisins eða deilistuðli oktanóls/vatns fyrir það (að því tilskildu að upptakan fylgi hraðafræði af fyrstu gráðu, sjá 3. viðbæti).

Upptökufasinn skal keyrður í 28 daga nema hægt sé að sýna fram á að stöðugt ástand hafi náðst fyrr (sjá 1. viðbæti, skilgreiningar og einingar). Stöðugt ástand sést í línuriti fyrir prófunarefni í fiski (C_f) á móti tíma þegar ferillinn verður samsíða tímaásnum og þrjár mælingar í röð á C_f í sýnum, sem eru tekin með að minnsta kosti tveggja daga millibili, gefa niðurstöður þar sem munur milli mælinga er innan við ± 20% og engin marktæk aukning á C_f á tímabilinu frá fyrstu til síðustu greiningar í röð. Þegar safnsýni eru greind þurfa hið minnsta fjórar greiningar að fara fram í röð. Ef upptaka prófunarefna er hæg er æskilegra að sjö dagar líði milli þess að sýni séu tekin. Ef stöðugt ástand hefur ekki náðst eftir 28 daga er annað hvort reiknaður út lífþéttnistuðull (BCF) með því að nota eingöngu hraðafræðilega aðferð, sem er ekki háð því að stöðugt ástand hafi náðst, eða þá að hægt er að lengja upptökufasann og halda mælingum áfram þangað til stöðugt ástand hefur náðst eða í 60 daga, eftir því hvort tímabilið er styttra. Styrkur prófunarefnisins í fiskunum við lok upptökufasans þarf einnig að vera nægilega mikill til að tryggja áreiðanlegt mat á k_2 úr hreinsunarfasanum. Ef marktæk upptaka sést ekki eftir 28 daga er hægt að stöðva prófunina.

Lengd hreinsunarfasa

Að því er varðar efni, sem fylgja hraðafræði af fyrstu gráðu, nægir tími sem samsvarar hálfri lengd upptökufasans venjulega til að það verði hæfileg minnkun á líkamsálagi af prófunarefninu (t.d. 95%) (sjá útskýringar á matinu í 5. viðbæti). Ef sá tími sem þarf til að ná 95% tapi er óheppilega langur, t.d. tvöfalt lengri en eðlilegur upptökufasi (þ.e. lengri en 56 dagar), má stytta tímann (þ.e. þar til styrkur prófunarefnisins er innan við 10% af styrknum við stöðugt ástand). Þó getur verið þörf á lengri hreinsunartímabilum fyrir efni sem eru með flóknara mynstur, að því er varðar upptöku og hreinsun, en kemur fram í eins hólfs fisklíkani með hraðafræði af fyrstu gráðu. Ef flókin mynstur af þessu tagi koma í ljós og/eða ef búist er við þeim er ráðlagt að leita ráða hjá líftölfræðingi og/eða lyfjahvarfafræðingi til að tryggja rétta uppsetningu prófunar. Þegar hreinsunartímabilið er framlengt getur fjöldi fiska til sýnatöku orðið takmarkandi og vaxtarmunur á fiskum getur haft áhrif á niðurstöður. Lengd tímabilsins ræðst einnig af lengd þess tímabils þar sem styrkur prófunarefnisins í fiskunum er yfir magngreiningarmörkum.

Fjöldi prófunarfiska

Fyrir hvern prófunarstyrk eru valdir það margir fiskar að a.m.k. fjórir fiskar séu tiltækir fyrir hvern sýnatökupunkt. Því aðeins skal hópa fiska ef greining á einum fiski er ekki möguleg. Ef ætlunin er að ná meiri nákvæmni í ferilaðlögun (og afleiddum mæliþáttum) eða ef krafist er efnaskiptarannsókna (t.d. til að greina á milli umbrotsefna og móðurefnis þegar geislamerkt prófunarefni eru notuð) er nauðsynlegt að fjölga fiskum á hverjum sýnatökupunkti. Ákvarða skal fituefnainnihaldið út frá sama líffræðilega efni og notað er til að ákvarða styrk prófunarefnisins. Verði því ekki við komið er e.t.v. þörf á fleiri fiskum (sjá 56. og 57. lið).

Ef notaður er fullorðinn fiskur (þ.e. kynþroska) á hann ekki að vera á gotstigi eða hafa nýlokið því (þ.e. goti lokið) annaðhvort áður en prófun hefst eða meðan á henni stendur. Einnig skal greina frá því hvort hængar eða hrygnur eða bæði hængar og hrygnur eru notuð í tilrauninni. Ef bæði kyn eru notuð skal skjalfest að munurinn á vexti og fituefnainnihaldi kynjanna sé ekki marktækur áður en váhrifin hefjast, einkum ef gert er ráð fyrir að nauðsynlegt sé að hópa hænga og hrygnur til að tryggja greinanlegan styrk efnis og/eða fituefnainnihald.

Í hverri prófun skal velja saman fiska af svipaðri þyngd þannig að þyngd þeirra smæstu sé aldrei undir tveimur þriðju af þyngd þeirra stærstu. Allir skulu vera af sama árgangi og uppruna. Þar eð þyngd og aldur fisks getur haft marktæk áhrif á gildi lífþéttnistuðulsins (12. heimild) skal skrá upplýsingar þar að lútandi nákvæmlega. Mælt er með því að undirsýni fiskstofnsins sé vigtað skömmu áður en prófun hefst til að áætla meðalþyngdina (sjá 61. lið).

Hleðsla

Nota skal mikið vatn í hlutfalli við fiska til að lágmarka minnkun á styrk prófunarefnasambandsins í vatninu sem verður þegar fiskunum er bætt við í upphafi prófunarinnar og einnig til að forðast að styrkur uppleysts súrefnis minnki. Mikilvægt er að hleðsluhlutfallið hæfi þeirri prófunartegund sem er notuð. Í öllum tilvikum er mælt með því að hleðsluhlutfall fiska og vatns sé að jafnaði 0,1–1,0 g fisks (blautvigt) fyrir hvern lítra vatns á dag. Hleðsluhlutföll fiska og vatns mega vera hærri ef sýnt er fram á að unnt sé að halda nauðsynlegum styrk prófunarefnisins innan ± 20% marka og að styrkur uppleysts súrefnis fari ekki undir 60% mettun (sjá 24. lið).

Við val á hæfilegu hleðslufyrirkomulagi skal taka tillit til eðlilegs búsvæðis fisktegundarinnar. Þannig getur t.d. botnfiskur þurft stærra botnsvæði í kerinu, miðað við tiltekið vatnsmagn, samanborið við fisk sem heldur sig að ofar í vatninu.

Fóðrun

Á aðlögunar- og prófunartímabilunum er fiskurinn fóðraður á viðeigandi fóðri með þekktu fitu- og heildarprótíninnihaldi og í þeim mæli að hann haldist heilbrigður og haldi líkamsþyngd sinni (einhver vöxtur er leyfilegur). Fóðra skal daglega meðan á aðlögunar- og prófunartímabilum stendur með fastsettu magni sem fer eftir tegundum sem notaðar eru, tilraunaskilyrðum og fjölda hitaeininga í fóðrinu (t.d. fyrir regnbogasilung á bilinu u.þ.b. 1–2% af líkamsþyngd á dag). Fóðrunarhlutfallið skal valið þannig að komið sé í veg fyrir hraðan vöxt og mikla aukningu fituefnainnihalds. Til að viðhalda sama fóðrunarhlutfalli skal endurútreikna magn fóðurs eins og við á, t.d. einu sinni í viku. Við þessa útreikninga má áætla þyngd fiskanna í hverju prófunarkeri út frá þyngd fiska úr sama keri sem síðast voru tekin sýni úr. Ekki skal vigta þá fiska sem eftir eru í því keri.

Daglega og skömmu eftir fóðurgjöf (að liðnum 30–60 mín.) skal sjúga burtu óétið fóður og saur úr prófunarkerjunum. Kerjum skal haldið svo hreinum sem framast er unnt alla prófunina til að halda styrk lífræns efnis eins lágum og hægt er (sjá 29. lið) þar eð tilvist lífræns kolefnis getur takmarkað lífaðgengi prófunarefnisins (12. heimild).

Þar eð margar tegundir fóðurs eru unnar úr fiskimjöli skal tryggt að fóðrið hafi ekki áhrif á niðurstöður úr prófunum eða hafi í för með sér skaðleg áhrif, t.d. með því að innihalda (í snefilmagni) varnarefni, þungmálma og/eða sjálft prófunarefnið.

Ljós og hiti

Mælt er með 12 til 16 klst. ljóslotu og hitastigið (± 2 °C) skal henta prófunartegundunum (sjá 3. viðbæti). Tegund og einkenni lýsingar skulu vera þekkt. Taka skal tillit til þess að prófunarefnið getur orðið fyrir ljósummyndun við þau ágeislunarskilyrði sem eru notuð í rannsókninni. Nota skal viðeigandi lýsingu til að varna því að fiskurinn verði fyrir váhrifum af völdum óeðlilegra ljósefnafræðilegra myndefna. Í sumum tilvikum getur verið heppilegt að nota síu til að útiloka útfjólublá geislun sem er undir 290 nm.

Prófunarstyrkleikar

Prófið var upphaflega hannað fyrir óskautuð lífræn efni. Að því er varðar þessa tegund efna er búist við að það nægi að láta fiska verða fyrir váhrifum af einum styrk þar eð ekki er búist við neinum styrkáhrifum en þó getur reynst nauðsynlegt að nota tvo styrkleika í tengslum við viðeigandi regluramma. Ef efni utan þessa sviðs eru prófuð eða ef aðrar vísbendingar um hugsanlegt styrkhæði eru þekktar skal keyra prófunina með tveimur styrkleikum eða fleiri. Ef einungis einn styrkur er prófaður skal færa rök fyrir notkun á einum styrk (sjá 79. lið). Styrkurinn sem er prófaður skal einnig vera eins lítill og gerlegt er eða tæknilega mögulegt (þ.e. ekki nálægt leysnimörkunum).

Í sumum tilvikum má gera ráð fyrir því að lífþéttni efnis sé háð styrknum í vatninu (t.d. að því er varðar málma þar sem hægt er að stjórna upptöku í fiskum a.m.k. að hluta til). Í því tilviki er nauðsynlegt að a.m.k. tveir, en helst fleiri, styrkleikar, sem skipta máli fyrir umhverfið, séu prófaðir (sjá 49. lið). Einnig er mælt með því að prófa a.m.k. tvo styrkleika þegar um er að ræða efni þar sem prófaðir styrkleikar verða, af hagkvæmnisástæðum, að vera nálægt leysnimörkum því þetta getur gefið innsýn í áreiðanleika váhrifastyrkleikanna. Við val á prófunarstyrk skal taka með umhverfislega raunhæfan styrk sem og þann styrk sem skiptir máli fyrir tilgang þessa sértæka mats.

Styrkur eða styrkleikar prófunarefnis skulu valdir þannig að þeir séu undir því gildi efnisins sem veldur langvinnum áhrifum eða 1% af þröngt aðfelldum miðgildisbanastyrk LC_{50} innan styrkbils sem skiptir máli umhverfislega séð og a.m.k. tugaþrepi ofan við magngreiningarmörk þess í vatni með þeirri greiningaraðferð sem er notuð. Einnig má ákvarða mesta leyfilega prófunarstyrk með því að deila í LC_{50} eftir 96 klst. með viðeigandi hlutfalli bráðra/langvinnra eiturhrifa (t.d. eru viðeigandi hlutföll fyrir sum efni u.þ.b. 3 en nokkur eru yfir 100). Ef annar styrkur er notaður skal munurinn á honum og styrknum hér að ofan vera með tugaþrepamillibili. Ef þetta er ógerlegt vegna viðmiðunarinnar fyrir eiturhrif (sem takmarkar efri mörk prófunarstyrks) og greiningarmarka (sem takmarka neðri mörk prófunarstyrks) er hægt að nota þrepamillibil sem er lægra en tíu og meta skal hvort nota skuli geislamerkt prófunarefni (með mesta hreinleika sem völ er á, þ.e. helst > 98%). Þess skal gætt að enginn styrkur sem er notaður sé yfir leysnimörkum prófunarefnisins í prófunarmiðlinum.

Samanburðir

Keyra skal einn samanburð með þynningarvatni eða, ef við á, (sjá 30. og 31. lið) einn samanburð sem inniheldur leysinn til viðbótar við prófunarraðirnar.

Tíðni mælinga á vatnsgæðum

Í prófuninni skal mæla uppleyst súrefni, heildarmagn lífræns kolefnis (TOC), sýrustig og hita í öllum prófunar- og samanburðarkerjum. Mæla skal heildarhörku og seltu (ef við á) í samanburði eða samanburðum og í einu keri. Ef tveir eða fleiri styrkleikar eru prófaðir skal mæla þessa þætti við hærri (eða hæsta) styrk. Uppleyst súrefni og selta (ef við á) skulu mæld að lágmarki þrisvar sinnum – í upphafi, í miðri prófuninni og við lok upptökutímabilsins – og vikulega á hreinsunartímabilinu. Heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) skal mælt í upphafi prófunar (24 og 48 klst. áður en upptökufasinn hefst) áður en fiskurinn er settur út í og a.m.k. vikulega, bæði í upptöku- og hreinsunarfösum. Hiti skal mældur og skráður daglega, sýrustig í upphafi og við lok hvers tímabils og harka einu sinni í hverri prófun. Æskilegt er að vakta hitann stöðugt í a.m.k. einu keri.

Sýnataka og greining á fiski og vatni

Áætlun um töku fisk- og vatnssýna

Taka skal vatnssýni úr prófunarkerjunum til að ákvarða styrk prófunarefnisins áður en fiskurinn er settur út í og bæði í upptöku- og hreinsunarfasa. Taka skal vatnssýni fyrir fóðrun, um leið og sýni er tekið úr fiskum. Tíðari sýnataka getur verið gagnleg til að tryggja stöðugan styrk eftir að fiskunum er bætt við. Ákvarða skal styrk prófunarefnisins meðan á upptökufasanum stendur til að kanna samræmi við gildisviðmiðanirnar (24. liður). Ef greiningar á vatnssýnum við upphaf hreinsunarfasa sýna að prófunarefnið greinist ekki er hægt að nota þetta sem rök fyrir því að mæla hvorki prófunarvatn né samanburðarvatn m.t.t. prófunarefnisins það sem eftir er hreinsunarfasans.

Taka skal sýni úr fiskum m.t.t. prófunarefnisins a.m.k. fimm sinnum meðan á upptökufasanum stendur og a.m.k. fjórum sinnum meðan hreinsunarfasinn stendur yfir. Í sumum tilvikum verður erfitt að áætla gildi lífþéttnistuðulsins af einhverri nákvæmni út frá þessum sýnafjölda, einkum ef vísbendingar eru um að hraðafræði upptöku og hreinsunar sé ekki af fyrstu gráðu, og því getur verið skynsamlegt að taka sýni oftar í báðum fösum (sjá 4. viðbæti).

Ákvarða skal fituefnainnihaldið í sama líffræðilega efninu og er notað til að ákvarða styrk prófunarefnis, a.m.k. við upphaf og lok upptökufasa og við lok hreinsunarfasa. Ef þetta er ekki mögulegt skal taka sýni úr a.m.k. þremur stökum fiskum til að ákvarða fituefnainnihald á hverjum og einum af þessum þremur tímapunktum. Í upphafi tilraunarinnar skal aðlaga fjölda fiska í hverju íláti til samræmis við það ([1]). Ef marktækt magn prófunarefnis greinist ekki í samanburðarfiskum (þ.e. fiskum úr stofnþýði) er að öðrum kosti hægt að greina samanburðarfiska úr prófuninni m.t.t. fituefnainnihalds eingöngu og hægt er að leiðrétta greiningu á prófunarefni í prófunarhóp(um) (og tengdan fasta fyrir upptökuhraða, hreinsunarhraðafasta og gildi lífþéttnistuðuls) m.t.t. breytinga samkvæmt fituefnainnihaldi í samanburðarhópnum meðan á prófuninni stendur ([2]).

Ekki skal greina dauða eða sýkta fiska m.t.t. prófunarefnis eða fituefnastyrks.

Dæmi um viðunandi sýnatökuáætlun er að finna í 4. viðbæti. Auðvelt er að reikna út aðrar áætlanir með því að nota önnur gefin gildi fyrir K_{OW} við útreikninga á váhrifatíma fyrir 95% upptöku (sjá útreikninga í 5. viðbæti).

Halda skal sýnatöku áfram meðan á upptökufasanum stendur þangað til stöðugt ástand hefur náðst (sjá 1. viðbæti, skilgreiningar og einingar) eða upptökufasanum lýkur (eftir 28 eða 60 daga, sjá 37. og 38. lið). Fiskurinn skal fluttur í hrein ker áður en hreinsunarfasinn hefst.

Sýnataka og undirbúningur sýnis

Vatnssýni til greiningar skulu tekin t.d. með því að sjúga upp vatnið með hvarftregu röri úr miðju prófunarkersins. Svo virðist sem hvorki síun né skiljun í skilvindu skilji alltaf þann hluta prófunarefnis sem er ekki lífaðgengilegur frá þeim sem er lífaðgengilegur. Ef aðskilnaðartækni er beitt skal prófunarskýrslan alltaf innihalda rök fyrir eða fullgildingu á aðskilnaðartækninni á grundvelli erfiðleika með lífaðgengi (25. heimild). Ekki skal meðhöndla sýni á þennan hátt, einkum ekki mjög vatnsfælin efni (þ.e. þau efni sem eru með log K_{OW} > 5) (12. og 26. heimild), ef ásog á síuefnivið eða skilvinduílát gæti átt sér stað. Þess í stað skulu gerðar ráðstafanir til að halda ílátunum svo hreinum sem framast er unnt (sjá 46. lið) og fylgjast skal með heildarmagni lífræns kolefnis bæði í upptöku- og hreinsunarfösunum (sjá 53. lið). Til að komast hjá hugsanlegum vandkvæðum varðandi skert lífaðgengi má nota sýnatöku með örútdrætti í fastfasa á torleysanleg efni og mjög vatnsfælin efni.

([1]) Ef ekki er gerð greining á fituefnainnihaldi í sama fiski og greining á prófunarefni er gerð í skal fiskurinn a.m.k. vera af svipaðri þyngd og (ef við á) af sama kyni.

([2]) Þessi valkostur er einungis gildur ef stærð hópa af fiskum er haldið svipaðri í öllum prófunarhópum, fiskar eru fjarlægðir samkvæmt sama mynstri og fóðraðir á sama hátt. Það tryggir að vöxtur fiska í öllum prófunarhópum sé svipaður ef prófaður styrkur er undir eitrunarstyrkbili. Ef vöxtur er svipaður er einnig búist við að fituefnainnihald sé svipað. Mismunandi vöxtur í samanburðarhóp myndi benda til áhrifa af efni og ógilda rannsóknina.

Fiskur, sem sýni er tekið úr, skal aflífaður strax með mannúðlegustu og heppilegustu aðferð sem völ er á (að því er varðar mælingar á heilum fiski skal hann einungis skolaður með vatni (sjá 28. lið) og þerraður). Fiskurinn skal veginn og heildarlengd hans mæld ([1]). Í hverjum einstökum fiski skal tengja vigtaða þyngd og mælda lengd við greindan styrk efnis (og fituefnainnihald, ef við á), t.d. með því að nota einkvæmt auðkenni fyrir hvern fisk sem sýni er tekið úr.

Æskilegt er að efnagreiningar á fiski og vatni fari fram strax að sýnatöku lokinni til að koma í veg fyrir niðurbrot eða annað tap og til að reikna út áætlaðan upptöku- og hreinsunarhraðafasta eftir því sem prófuninni miðar. Ef greiningar eru gerðar þegar í stað er einnig hægt að koma í veg fyrir seinkaða ákvörðun á því að jafnvægi (stöðugt ástand) hafi náðst.

Ef greining er ekki gerð strax skal geyma sýnin með viðeigandi aðferð. Áður en rannsókn hefst skal afla upplýsinga um viðeigandi geymsluaðferð fyrir tiltekna prófunarefnið — t.d. djúpfrysting, geymsla við 4 °C, útdráttur o.s.frv. Velja skal tímalengd geymslu til að tryggja að efnið hafi ekki brotnað niður meðan það er í geymslunni.

Gæði efnagreiningaraðferðar

Þar eð öll aðferðin ræðst í meginatriðum af nákvæmni, samkvæmni og næmi þeirrar greiningaraðferðar sem er notuð fyrir prófunarefnið skal kanna með tilraunum hvort nákvæmni, samkvæmni og samanburðarnákvæmni efnagreiningarinnar, svo og endurheimt prófunarefnisins úr bæði vatni og fiski séu fullnægjandi að því er varðar viðkomandi aðferð. Þetta skal vera hluti af forprófunum. Einnig skal ganga úr skugga um að prófunarefnið greinist ekki í þynningarvatninu sem er notað. Ef nauðsyn krefur skal leiðrétta gildi fyrir styrk prófunarefnis í vatni og fiski, sem fæst í prófuninni, fyrir endurheimt og bakgrunnsgildi samanburða. Fisk- og vatnssýni skulu ávallt meðhöndluð þannig að mengun og tap séu í lágmarki (t.d. vegna ásogs sýnatökubúnaðarins).

Greining fisksýna

Ef geislamerkt efni eru notuð í prófuninni getur greiningin miðast við allt geislamerkta efnið (þ.e. móðurefni og umbrotsefni) en einnig má hreinsa sýnin þannig að hægt sé að greina móðurefnið sérstaklega. Ef lífþéttnistuðull á að byggjast á móðurefni skal lýsa eiginleikum helstu umbrotsefna, a.m.k. við lok upptökufasans (sjá 6. lið). Helstu umbrotsefni eru þau sem eru dæmigerð fyrir ≥ 10% af heildarleifum í fiskvefjum, þau sem eru dæmigerð fyrir ≥ 5% í tveimur samfelldum sýnatökupunktum, þau sem sýna hækkandi gildi í öllum upptökufasanum og þau sem vitað er að skipta máli í eiturefnafræðilegu tilliti. Ef lífþéttnistuðull fyrir heilan fisk með tilliti til heildarmagns geislamerktra leifa er ≥ 500 getur verið ráðlegt — og eindregið mælt með því að því er varðar tiltekna flokka efna, s.s. varnarefni — að sanngreina og magngreina helstu umbrotsefni. Sum eftirlitsyfirvöld kunna að krefjast magnákvörðunar á slíkum umbrotsefnum. Ef þau niðurbrotsefni sem eru ≥ 10% af geislamerktum heildarleifum í fiskvef eru sanngreind og magn þeirra ákvarðað er einnig mælt með því að slíkt hið sama sé gert að því er varðar niðurbrotsefni í prófunarvatninu. Ef þetta er ekki mögulegt skal útskýra það í skýrslunni.

Styrkur prófunarefnisins skal að jafnaði ákvarðaður fyrir hvern einstakan vigtaðan fisk. Ef þetta er ekki mögulegt má hópa sýni í hverri sýnatöku en hópun takmarkar þær tölfræðiaðferðir sem hægt er að nota á gögnin þannig að prófunin skal ná til nægilega margra fiska til að hún samrýmist þeirri hópun, aðferð og tölfræðilegu vissu sem sóst er eftir. Hægt er að nota 27. og 28. heimild sem inngang að viðeigandi verklagi við hópun.

([1]) Til viðbótar við þyngd skal skrá heildarlengd því samanburður á lengdaraukningu meðan á prófuninni stendur er góður mælikvarði á það hvort skaðleg áhrif hafi orðið.

Lífþéttnistuðullinn skal gefinn upp sem staðlaður samkvæmt fiski með 5% fituefnainnihald (byggt á blautvigt) til viðbótar við gildið sem fæst beint úr rannsókninni (sjá 21. lið), nema hægt sé að halda því fram að prófunarefnið safnist ekki fyrst og fremst upp í fituefni. Ákvarða skal fituefnainnihald fisksins í hverri sýnatöku ef unnt er, helst á sama útdrætti og þeim sem er notaður í greiningunni á prófunarefninu því það þarf oft að fjarlægja fituefnin úr útdrættinum áður en hægt er að greina hann með litskiljun. Þó útheimtir greining á prófunarefnum oft sérstakar útdráttaraðferðir sem geta stangast á við prófunaraðferðir til að ákvarða fituefni. Í því tilviki (þar til heppilegar aðferðir með tækjum sem valda ekki skaða eru tiltækar) er mælt með að nota aðra áætlun til að ákvarða fituefnainnihald í fiski (sjá 56. lið). Nota skal viðeigandi aðferðir til að ákvarða fituefnainnihald (20. heimild). Mæla má með klóróform-/metanólútdráttartækni (29. heimild) sem staðalaðferð (30. heimild) en mælt er með Smedes-aðferðinni (31. heimild) sem staðgöngutækni. Síðari aðferðin einkennist af sambærilegri útdráttarhæfni, mikilli nákvæmni, notkun á leysum sem eru ekki eins eitraðir og er auðveld í notkun. Hægt er að nota aðrar aðferðir með nákvæmni sem kemur vel út í samanburði við aðferðirnar sem mælt er með ef færð eru tilhlýðileg rök fyrir því. Mikilvægt er að gefa upplýsingar um aðferðina sem er notuð.

Mæling á vexti fiska

Við upphaf prófunar þarf að vega fimm til tíu fiska úr stofnþýði, hvern fyrir sig, og mæla heildarlengd þeirra. Þetta mega vera sömu fiskar og eru notaðir í greiningu á fituefnum (sjá 56. lið). Vega skal þyngd og mæla lengd fiska sem eru notaðir í hverri sýnatöku, bæði úr prófunar- og samanburðarhópum, áður en efnagreining eða greining á fituefnum er framkvæmd. Hægt er að nota mælingar á þessum fiski, sem sýni eru tekin úr, til að áætla þyngd og lengd fiska sem eftir eru í prófunar- og samanburðarílátum (sjá 45. lið).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Upptökuferill prófunarefnisins fæst með því að teikna styrk þess í/á fiski (eða tilgreindum vefjum) í upptökufasanum sem fall af tíma á línulegum kvarða. Ef ferillinn hefur náð jafnvægi, þ.e. orðinn nokkurn veginn aðfelldur tímaásnum, skal reikna lífþéttnistuðulinn (BCFss) fyrir stöðugt ástand út frá:

$$\frac{C_f \text{við stöðugt ástand(meðaltal)}}{C_w \text{við stöðugt ástand(meðaltal)}}$$

Þróun C_f getur orðið fyrir áhrifum af vexti fiskanna (sjá 72. og 73. lið). Meðaltal váhrifastyrks (C_w) verður fyrir áhrifum af breytileika yfir lengri tíma. Ætla má að tímaveginn meðaltalsstyrkur skipti meira máli og sé nákvæmari í rannsóknum á uppsöfnun í lífverum þó að það sé breytileiki innan viðeigandi gildissviðs (sjá 24. lið). Hægt er að reikna út tímavegið meðaltal (TWA) styrks í vatni skv. 1. hluta 5. viðbætis.

Ákvarða skal stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) sem hlutfallið k_1/k_2,milli fastanna tveggja við hraðafræði af fyrstu gráðu. Hægt er að leiða út hraðafasta k_1 og k_2 og stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) með því að aðlaga samtímis upptöku- og hreinsunarfasann. Að öðrum kosti er hægt að ákvarða k_1 og k_2 í röð (sjá lýsingu og samanburð á þessum aðferðum í 5. viðbæti). Ef til vill þarf að leiðrétta hreinsunarhraðafastann (k_2) fyrir þynningu vegna vaxtar (sjá 72. og 73. lið). Ef augljóst er að upptöku- og/eða hreinsunarferillinn er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (sjá heimildir í 5. viðbæti) og leita ráða hjá líftölfræðingi og/eða lyfjahvarfafræðingi.

Gögn um þyngd/lengd fiska

Blautvigt og heildarlengd hvers fisks fyrir sig fyrir hverja sýnatöku eru settar upp í töflu, aðskilið fyrir prófunar- og samanburðarhópa meðan á upptöku- og hreinsunarfösum stendur (þ.m.t. stofnþýði þegar upptaka hefst). Í hverjum einstökum fiski skal tengja vigtaða þyngd og mælda lengd við greindan styrk íðefnis, t.d. með því að nota einkvæmt auðkenni fyrir hvern fisk sem sýni er tekið úr. Þyngd er ákjósanlegasti mælikvarðinn á vöxt í þeim tilgangi að leiðrétta gildi lífþéttnihraðastuðuls m.t.t. þynningar vegna vaxtar (sjá aðferðir sem eru notaðar til að leiðrétta gögn m.t.t. þynningar vegna vaxtar í 73. lið og 5. viðbæti).

Leiðrétting m.t.t. þynningar vegna vaxtar og stöðlun fituefna

Vöxtur fisks meðan á hreinsunarfasa stendur getur lækkað mældan styrk íðefna í fiskinum sem veldur því að heildarhreinsunarhraðafastinn (k_2) er hærri en hann yrði eftir fjarlægingarferlið (t.d. öndun, efnaskipti, losun úrgangsefna úr líkamanum) eitt og sér. Leiðrétta skal lífþéttnihraðastuðla m.t.t. þynningar vegna vaxtar. Vöxtur hefur einnig áhrif á lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) en ekki er til nein samþykkt aðferð til að leiðrétta lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand fyrir vöxt. Ef um er að ræða verulegan vöxt skal einnig leiða út lífþéttnihraðastuðul (BCF_K), sem er leiðréttur m.t.t. vaxtar (BCF_{Kg}), þar eð hann getur verið mikilvægari mælikvarði á lífþéttnistuðulinn. Fituefnainnihald prófunarfisks (sem hefur sterk tengsl við uppsöfnun vatnsfælinna efna í lífverum) getur verið mjög breytilegt í raun þannig að nauðsynlegt reynist að staðla það samkvæmt fastsettu fituefnainnihaldi í fiski (5% massahlutfall) til að sýna bæði lífþéttnihraðastuðla og lífþéttnistuðla fyrir stöðugt ástand á gagnlegan hátt nema hægt sé að halda því fram að prófunarefnið safnist ekki fyrst og fremst saman í fituefnum (t.d. geta nokkur perflúoruð efni bundist prótínum). Jöfnur og dæmi fyrir þessa útreikninga er að finna í 5. viðbæti.

Til að leiðrétta lífþéttnihraðastuðul m.t.t. þynningar vegna vaxtar skal leiðrétta hreinsunarhraðafasta m.t.t. vaxtar. Þessi vaxtarleiðrétti hreinsunarhraðafasti (k_{2g}) er reiknaður út með því að draga vaxtarhraðafastann (k_g, eins og hann fæst úr gögnum um vigtaða þyngd) frá heildarhreinsunarhraðafastanum (k_2). Vaxtarleiðréttur stuðull fyrir hraða lífþéttni er síðan reiknaður út með því að deila í fasta fyrir upptökuhraða (k_1) með vaxtarleiðréttum hreinsunarhraðafasta (k_{2g}) (sjá 5. viðbæti). Í sumum tilvikum hefur þessi aðferð vandkvæði í för með sér. Að því er varðar efni sem eru lengi að skolast út og eru prófuð í fiski sem vex hratt getur t.d. útreiknað k_{2g} orðið mjög lítið og þar með verður skekkjan í hraðaföstunum tveimur, sem eru notaðir til að leiða hana út, varhugaverð og í sumum tilvikum getur áætlað *k*g orðið stærra en k_2. Í staðgönguaðferð sem sniðgengur þörfina á leiðréttingu m.t.t. þynningar vegna vaxtar þarf að nota gögn um massa prófunarefnis á hvern fisk (heill fiskur) úr hreinsun fremur en gögn um massa prófunarefnis á hverja einingu fiskmassa (styrkur), eins og venjan er. Þessu má auðveldlega ná fram þar eð prófanir samkvæmt þessari prófunaraðferð ættu að tengja skráðan styrk í vef við þyngd einstakra fiska. Einföld aðferð til að gera þetta er tilgreind í 5. viðbæti. Athygli er vakin á því að enn skal tilgreina k_2 þó að þessi staðgönguaðferð sé notuð.

Einnig skal gera grein fyrir lífþéttnihraðastuðli og lífþéttnistuðli fyrir stöðugt ástand miðað við staðlað fituefnainnihald í fiski sem nemur 5% (massahlutfall) nema hægt sé að halda því fram að prófunarefnið safnist ekki fyrst og fremst saman í fituefnum. Gögn um styrk í fiski, eða lífþéttnistuðull, eru stöðluð samkvæmt hlutfallinu á milli 5% og raunverulegs (einstaklingsbundins) meðaltals fituefnainnihalds (í %, blautvigt), sjá 5. viðbæti).

Ef efnafræðileg greining og greining á fituinnihaldi hafa verið gerðar á sömu fiskum skal nota stöðluð gögn um fituefnainnihald í hverjum fiski fyrir sig til að reikna út staðlaðan lífþéttnistuðul fituefna. Ef vöxtur fiska í samanburðarhópi og váhrifahópi er svipaður er að öðrum kosti hægt að nota fituefnainnihald í samanburðarfiskum eingöngu til að leiðrétta fituefnainnihald (sjá 56. lið). Aðferð til að reikna út staðlaðan lífþéttnistuðull fituefna er lýst í 5. viðbæti.

Túlkun niðurstaðna

Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældur styrkur prófunarlausna er nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar.

Að jafnaði skal ekki vera marktækur munur á meðalvexti í prófunar- og samanburðarhópum til að útiloka eiturhrif. Bera skal saman vaxtarhraðafasta eða vaxtarferla hópanna tveggja með viðeigandi aðferð ([1]).

([1]) Hægt er að gera *t*-próf á vaxtarhraðaföstum til að prófa hvort vöxtur í samanburðar- og prófunarhópum er mismunandi eða *F*-próf ef um er að ræða dreifnigreiningu. Ef þörf krefur er hægt að nota *F*-próf eða próf á sennileikahlutfalli (e. *likelihood ratio test*) til að hjálpa til við að velja heppilegt vaxtarlíkan (greinargerð Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 (32. heimild)).

Vel skilgreindir ferlar fyrir upptöku og hreinsun eru vísbending um að gögn fyrir lífþéttni séu traust. Að því er varðar hraðafasta ættu niðurstöður úr χ^2-prófi á mátgæðum að sýna góð mátgæði (þ.e. lágt hlutfall mælingarskekkja (32. heimild)) fyrir líkan af uppsöfnun í lífverum þannig að hraðafastarnir geti talist áreiðanlegir (sjá 5. viðbæti). Ef fleiri en einn prófunarstyrkur er notaður skal breytileiki milli upptöku-/hreinsunarfasta milli prófunarstyrkleika vera minni en 20% ([1]). Ef ekki gæti það verið merki um styrkhæði. Ef fram kemur marktækur munur á upptöku-/hreinsunarhraðaföstum milli styrkleika sem eru notaðir í prófuninni skal skrá hann og reyna að skýra hann. Almennt séð eru 95% öryggismörk lífþéttnistuðla í rannsóknum með vel heppnaðri tilhögun í kringum ± 20% af lífþéttnistuðli sem er leiddur út.

Ef tveir styrkleikar eða fleiri eru prófaðir eru niðurstöður um báða eða alla styrkleika notaðar til að rannsaka hvort niðurstöðunum ber saman og til að sýna hvort um styrkhæði sé að ræða. Ef einungis einn styrkur er prófaður til að fækka dýrum sem eru notuð og/eða tilföngum skal færa rök fyrir notkun á einum styrk.

Lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) sem af þessu leiðir er vafasamur ef lífþéttnihraðastuðull (BCF_K) er marktækt hærri en lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) þar eð slíkt getur bent til þess að stöðugt ástand hafi ekki náðst eða að þynning vegna vaxtar og eyðingarferlar hafi ekki verið tekin með í reikninginn. Í tilvikum þar sem lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) er miklu hærri en lífþéttnihraðastuðullinn (BCF_K) skal athuga hvort um villur er að ræða í upptöku- og hreinsunarhraðaföstunum og endurmeta þá. Annars konar aðlögunaraðferð gæti bætt mat á lífþéttnihraðastuðli (BCF_K) (sjá 5. viðbæti).

Prófunarskýrsla

Prófunarskýrslan inniheldur eftirfarandi upplýsingar, að undanskildum upplýsingum um prófunarefni sem eru tilgreindar í 3. lið:

Prófunarefni:

Eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar.

— Efnafræðileg sanngreiningargögn, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv., (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis, ef við á).

— Að því er varðar fjölþáttaefni og UVCB-efni (efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni): lýsingu, eins og kostur er, á efnakenni einstakra efnisþátta og, fyrir hvern og einn, hundraðshluta hans í heildarmassa efnisins. Taka skal saman hvernig greiningaraðferðirnar, sem eru notaðar í prófuninni, endurspegla mælingu á styrk efnisins; öllum greiningarferlum skal lýst, þ.m.t. nákvæmni aðferðarinnar, greiningarmörk hennar og magngreiningarmörk.

— Ef efnið er geislamerkt, nákvæm staðsetning geislamerktu frumeindarinnar, eða frumeindanna, og hlutfall geislavirkni sem tengist óhreinindum.

— Upplýsingar um eiturhrif prófunarefnisins á fiska (helst prófunartegundir). Gera skal grein fyrir eiturhrifum sem bráðum 96 klst LC_{50} og mörkum um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEC) og lægstu mörkum um merkjanleg, skaðleg áhrif (LOAEC) úr langtímarannsókn (þ.e. prófun á fyrri stigum lífs í lífsferlinum eða heildarlífsferlisprófun, liggi þær fyrir).

— Geymsluskilyrði prófunaríðefnis eða prófunarefnis og stöðugleiki prófunaríðefnis eða prófunarefnis við geymsluskilyrðin ef þau eru geymd fyrir notkun.

Prófunartegund:

Vísindaheiti, stofn, uppruni, hvers kyns formeðhöndlun, aðlögun, aldur, kyn (ef við á), stærðarflokkur (þyngd og lengd) o.s.frv.

([1]) Þessi hundraðshluti byggist á því að greiningaraðferðirnar séu áreiðanlegar og að helmingunartíminn sé < 14 dagar. Ef greiningaraðferðirnar eru ekki alveg áreiðanlegar eða ef helmingunartíminn eykst (mikið) verða þessar tölur stærri.

Prófunarskilyrði:

— Prófunaraðferð sem er notuð (t.d. gegnumstreymi eða hálfkyrrstaða), venjuleg rannsókn eða smækkuð tilhögun (þ.m.t. rök og forsendur).

— Tegund og einkenni þeirrar lýsingar sem er notuð og ljóslota eða ljóslotur.

— Tilhögun prófunar (t.d. fjöldi og stærð prófunarkerja, hve hratt er skipt um vatn, hleðsluhlutfall, fjöldi kerja fyrir samhliða prófanir, fjöldi fiska á hvert ker samhliða prófana, fjöldi prófunarstyrkleika, lengd upptöku- og hreinsunarfasanna og tíðni sýnatöku fyrir fisk og vatn).

— Aðferð við tilreiðslu stofnlausna og tíðni endurnýjunar (ef leysir er notaður skal tilgreina styrk hans og hlutdeild í innihaldi lífræns kolefnis í prófunarvatninu) eða lýsing á annars konar skömmtunarkerfi.

— Nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarkerjunum og sú aðferð og tíðni sem er notuð til að reikna þessi gildi.

— Uppruni þynningarvatns, lýsing á hvers kyns formeðhöndlun, niðurstöður úr tilraunum sem eru gerðar til að sýna fram á hæfni prófunarfisksins til að lifa í vatninu og eiginleikar vatnsins: sýrustig, harka, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir, selta í prófunarmiðlinum (ef við á) og allar aðrar mælingar sem gerðar eru.

— Vatnsgæði í prófunarkerjum, sýrustig, harka, heildarmagn lífræns kolefnis (TOC), hitastig og styrkur uppleysts súrefnis, aðferðir sem eru notaðar og tíðni mælinga.

— Nákvæmar upplýsingar um fóðrun, t.d. tegund fóðurs, uppruni, samsetning (a.m.k. að því er varðar fituefna- og prótíninnihald ef unnt er), fóðrunarhlutfall sem er valið, hve mikið er gefið og hve oft.

— Upplýsingar um meðhöndlun fisk- og vatnssýna, þ.m.t. nákvæmar upplýsingar um tilreiðslu, geymslu, útdráttar- og greiningaraðferðir (og samkvæmni) varðandi prófunarefnið og fituefnainnihaldið.

— Aðferðir sem eru notaðar til að slembiraða meðhöndlunum og skipta fiskum í prófunarkerin.

— Dagsetning þegar prófunarlífverur eru settar í prófunarlausnir og tímalengd prófunar.

— Lýsing á skammtastærðarrannsóknum og niðurstöður, ef þær liggja fyrir.

Niðurstöður:

— Niðurstöður úr hvers kyns forrannsókn sem er gerð.

— Dánartíðni samanburðarfiska og fiska í hverju váhrifakeri, svo og hvers kyns óeðlilegt atferli.

— Upplýsingar um öll skaðleg áhrif sem verður vart.

— Ítarleg lýsing á öllum efnagreiningaraðferðum sem eru notaðar, þ.m.t. greiningarmörk og magnákvörðun, breytileiki og endurheimt.

— Fituefnainnihald fisksins, þ.m.t. aðferð sem er notuð, og stuðull til að staðla fituefni (e. *lipid normalisation factor*), ef hann er leiddur út, (L_n, stuðull til að gefa upp niðurstöður miðað við 5% fituefnainnihald í fiski).

— Gögn um þyngd fiska (og lengd), sett upp í töflu, tengd við styrk íðefnis í hverjum fiski fyrir sig (og fituefnainnihald, ef við á), bæði fyrir samanburðar- og váhrifahópa, (t.d. með því að nota einkvæmt auðkenni fyrir hvern fisk sem sýni er tekið úr) og útreikningar á afleiddum vaxtarhraðafasta eða -föstum.

— Gögn um styrk prófunarefnis í fiski, sett upp í töflu (C_f, tengt við hvern fisk fyrir sig), og vatni (C_w) (ásamt meðalgildum fyrir prófunarhóp og samanburðarhóp, staðalfrávik og styrkbil, ef við á) fyrir alla sýnatökutíma (C_f gefið upp í mg/kg blautvigtar alls skrokksins eða tiltekinna vefja hans, t.d. fituefni, og C_w í mg/l). C_w-gildi fyrir samanburðarröðina (bakgrunnsgildi skulu einnig tilgreind).

— Ferlar (þ.m.t. öll mæld gögn) sem sýna eftirfarandi (ef við á má gefa styrk upp í hlutfalli við allan skrokkinn og fituefnainnihald staðlað samkvæmt 5% í dýrinu eða tilteknum vefjum úr því):

  — vöxtur, þ.e. þyngd fisks á móti tíma eða náttúrulegur logri umbreyttrar þyngdar á móti tíma (þ.m.t. afleiddur vaxtarhraðafasti, k_g),

  — upptaka og hreinsun prófunarefnis í fiskinum (á einu línuriti),

  — tímalengd að stöðugu ástandi (ef það næst),

  — náttúrulegur logri umbreytts styrks á móti upptökutíma (þ.m.t. afleiddur fasti fyrir upptökuhraða k_1),

  — náttúrulegur logri umbreytts styrks (ln-styrkur) á móti hreinsunartíma (þ.m.t. afleiddur hreinsunarhraðafasti k_2), og

  — ferlar fyrir upptöku- og hreinsunarfasa sem sýna bæði gögnin og aðlagaða líkanið.

— Ef sjónræn skoðun á línuriti sýnir greinilega einfara er hægt að nota tölfræðilega marktæka einfaraprófun til að fjarlægja falska gagnapunkta sem og sem skjalfest rök fyrir því að sleppa þeim.

— Lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) ef stöðugt ástand næst (næstum því).

— Lífþéttnihraðastuðull (BCF_K) og afleiddir upptöku- og hreinsunarhraðafastar k_1 og k_2 ásamt dreifni í k_2 (hallatala og skurðpunktur) ef raðbundin aðlögun er notuð.

— Öryggismörk, staðalfrávik (eftir því sem það liggur fyrir) og aðferðir við útreikning/gagnagreiningu fyrir hvern mæliþátt fyrir hvern styrk prófunarefnis sem er notaður.

  — Allar upplýsingar sem varða geislamerkt umbrotsefni prófunarefnis og uppsöfnun þeirra.

  — Vaxtarhraðafasti eða -fastar (þ.m.t. 95% öryggisbil) og útreiknaður, vaxtarleiðréttur hreinsunarhraðafasti (k_{2g}), helmingunartími og gildi fyrir lífþéttnistuðul (vaxtarleiðréttur stuðull fyrir hraða lífþéttni, BCF_{Kg})).

  — Hvaðeina sem telst óvenjulegt í prófuninni, öll frávik frá þessum aðferðum og allar aðrar upplýsingar sem skipta máli.

  — Yfirlitstafla um viðeigandi mæld og útreiknuð gögn sem hér segir:

Fastar fyrir upptöku- og hreinsunarhraða efnis og lífþéttnistuðlar (BCF)	
k_g (vaxtarhraðafasti, dagur^{-1}):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
k_1 (heildarupptökuhraðafasti; l kg^{-1} dagur^{-1}):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
k_2 (heildarhreinsunarhraðafasti, dagur^{-1}):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
k_{2g} (vaxtarleiðréttur hreinsunarhraðafasti, dagur^{-1}):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
C_f (styrkur íðefnis í fiski við stöðugt ástand, mg kg^{-1}):	Bætið við gildi ± SD ([2])
C_w (styrkur íðefnis í vatni, mg l^{-1}):	Bætið við gildi ± SD ([2])
L_n (stuðull til að staðla fituefni):	Bætið við gildi ([3])

Fastar fyrir upptöku- og hreinsunarhraða efnis og lífþéttnistuðlar (BCF)	
BCF_{SS} (lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand, l kg^{-1})	Bætið við gildi ± SD ([2])
BCF_{SSL} (staðlaður lífþéttnistuðull fituefna við stöðugt ástand, l kg^{-1}):	Bætið við gildi ([3]) ± SD ([2])
BCF_{K} (lífþéttnihraðastuðull, l kg^{-1})	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
BCF_{Kg} (vaxtarleiðréttur stuðull fyrir hraða lífþéttni, l kg^{-1})	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
$t_{1/2g}$ (vaxtarleiðréttur helmingunartími, dagur):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
BCF_{KL} (staðlaður lífþéttnihraðastuðull fituefna, l kg^{-1}):	Bætið við gildi
BCF_{KLG} (staðlaður vaxtarleiðréttur lífþéttnihraðastuðull fituefna, l kg^{-1}):	Bætið við gildi

([1]) CI: öryggisbil (þegar unnt er að meta það)

([2]) SD: Staðalfrávik (þegar unnt er að meta það)

Forðast skal niðurstöður á borð við „greinist ekki/magngreint við greiningarmörk/magnákvörðun“ með þróun á aðferðum í undanfara prófananna og tilhögun tilraunar þar eð ekki er unnt að nota slíkar niðurstöður við útreikninga á hraðaföstum.

C.13 - II: **Smækkuð prófun á vatnstengdum váhrifum á fiska**

INNGANGUR

Sú aukna reynsla sem fengist hefur við framkvæmd og túlkun á heildarprófuninni, bæði hjá rannsóknarstofum og eftirlitsaðilum, sýnir að hraðafræði af fyrstu gráðu gildir, með ákveðnum undantekningum, um mat á upptöku- og hreinsunarhraðaföstum. Því er hægt að meta upptöku- og hreinsunarhraðafasta með lágmarksfjölda sýnatökupunkta og leiða út lífþéttnihraðastuðul.

Upphaflegur tilgangur með því að rannsaka annars konar tilhögun rannsókna á lífþéttnistuðlum var að þróa lítið próf til að nota í milliliggjandi prófunarþrepi til að hrekja eða staðfesta möt á lífþéttnistuðlum, sem byggjast á K_{OW} og megindlegum venslum efnabyggingar og virkni (QSAR), og útiloka þörf á fullnaðarrannsókn á mörgum efnum og til að lágmarka kostnað og notkun á dýrum með því að draga úr tíðni sýnatöku og fjölda greiningarraða. Jafnframt því að helstu tilhögun fyrri prófunaraðferðar er fylgt til að gera kleift að aðlaga niðurstöður úr prófun að fyrirliggjandi gögnum um lífþéttnistuðul, og til að auðvelda framkvæmd prófunar og túlkunar á gögnum, var markmiðið að leggja fram möt á lífþéttnistuðlum sem væru nægilega nákvæm og samkvæm fyrir áhættumatsákvarðanir. Að mörgu leyti gilda sömu atriði og í heildarprófuninni, t.d. gildisviðmiðanir (sjá 24. lið) og að hætta prófun ef óveruleg upptaka sést við lok upptökufasans (sjá 16. og 38. lið).

Efni sem eru tæk í smækkaða tilhögun prófunar skulu tilheyra því almenna sviði sem þessi prófunaraðferð var þróuð fyrir, þ.e. óskautuð lífræn efni (sjá 49. lið). Ef eitthvað bendir til þess að efnið sem á að prófa gæti sýnt aðra eiginleika (t.d. greinilegt frávik frá hraðafræði af fyrstu gráðu) skal gera heildarprófun í eftirlitsskyni.

Alla jafna er smækkuð prófun ekki keyrð í styttri tíma en stöðluð lífþéttnistuðulsprófun en í hana þarf færri sýni úr fiski (sjá rök í 6. viðbæti). Þó er hægt að stytta hreinsunartímabilið fyrir efni sem skolast hratt út til að forðast að styrkurinn í fiskunum falli undir greiningar-/magngreiningarmörk áður en prófun lýkur. Hægt er að nota smækkaða prófun á váhrifum á fiska með einum styrk til að ákvarða hvort þörf sé á heildarprófun og ef gögnin sem af þessu leiða, sem eru notuð til að reikna út hraðafasta og lífþéttnistuðul, eru traust (sjá 93. lið) er hægt að veita undanþágu frá heildarprófun ef lífþéttnistuðullinn sem af þessu leiðir er langt frá eftirlitsgildum sem gefa tilefni til áhyggna.

Í sumum tilvikum getur verið hagkvæmt að nota smækkaða tilhögun prófunar með fleiri en einum prófunarstyrk sem forprófun til að ákvarða hvort möt á lífþéttnistuðli fyrir efni séu styrkháð. Ef möt á lífþéttnistuðli úr smækkaðri prófun sýna styrkhæði er nauðsynlegt að gera heildarprófun. Ef möt á lífþéttnistuðli eru ekki styrkháð, á grundvelli slíkrar smækkaðrar prófunar, en niðurstöðurnar teljast ekki endanlegar er hægt að framkvæma heildarprófun með einum styrk og draga þannig úr notkun á dýrum samanborið við heildarprófun með tveimur (eða fleiri) styrkleikum.

Efni, sem koma hugsanlega til greina í smækkaða prófun, skulu:

— vera líkleg til að sýna áætlaða hraðafræði upptöku og hreinsunar af fyrstu gráðu, þ.e. leitt út frá ályktun út frá byggingarlega hliðstæðum efnum um svipuð efni,

— vera með log K_{OW} < 6 nema búist sé við hröðum efnaskiptum ([1]),

— vera nægilega vatnsleysanleg, að því er varðar greiningartæknina (sjá 24. lið),

— vera auðmælanleg (þ.e. styrkleikar skulu vera a.m.k. einu tugaþrepi ofan við magngreiningarmörk), bæði í fiskum og vatni; mælt er með merkingu með geislavirku efni (sjá 23. lið) og

— vera með hreinsunartíma sem er lengri en helmingunartíminn sem búist er við (sjá útreikninga í 5. viðbæti) eða aðlaga lengd hreinsunarinnar til samræmis við það (sjá 91. lið). Undantekning frá þessari reglu er leyfð ef búast má við hröðum efnaskiptum m.t.t. efnisins.

SÝNATÖKUÁÆTLUN FYRIR RANNSÓKNIR Í KJÖLFAR SMÆKKUÐU TILHÖGUNARINNAR

Sýnataka úr fiski

Sýnatöku úr fiskum er fækkað niður í fjóra sýnatökupunkta:

— Í miðjum upptökufasanum og við lok hans (síðarnefndi tíminn er einnig upphaf hreinsunar), t.d. eftir 14 og 28 daga (33. heimild).

— Í miðjum hreinsunarfasanum og við lok rannsóknar (þegar styrkur efnis er < 10% af hámarksstyrk eða a.m.k. greinilega kominn niður fyrir einn helmingunartíma efnisins) t.d. eftir 7 og 14 daga hreinsun (33. heimild). Ef búist er við hraðri hreinsun eða hún kemur fram getur reynst nauðsynlegt að stytta hreinsunartímabilið til að forðast að styrkurinn í fiskunum falli niður fyrir magngreiningarmörk.

— Fituefnamæling eins og í fullnaðarrannsókn.

— Leiðrétting vegna vaxtar eins og í fullnaðarrannsókn.

— Lífþéttnistuðull er reiknaður út sem lífþéttnihraðastuðull.

Vatnssýnataka

Að því er varðar smækkuðu tilhögunina eru tekin sýni úr vatninu eins og í fullnaðarrannsókn (sjá 54. lið) eða a.m.k. fimm sinnum, dreift jafnt niður á upptökufasann, og vikulega í hreinsunarfasanum.

([1]) Í reynd er hægt að nota smækkaða prófun til að sýna fram á hröð efnaskipti þegar vitað er að hröð efnaskipti eru líkleg.

Breytingar á tilhögun

Að teknu tilliti til eiginleika prófunarefnisins, gildra spáa um megindleg vensl efnabyggingar og virkni og sérstakan tilgang með rannsókninni má íhuga að gera einhverjar breytingar á tilhögun rannsóknarinnar:

— Ef þörf er á meiri nákvæmni er hægt að nota fleiri fiska (6 eða 8 í stað 4) til sýnatöku við lok upptökufasans.

— Aukahópi fiska er bætt við til notkunar ef hreinsun eftir 14 daga (eða við áætluð lok hreinsunarfasans) hefur ekki dugað til að tryggja fullnægjandi hreinsun (þ.e. > 50%). Ef áætluð lengd hreinsunarfasans er styttri eða lengri en 14 dagar skal aðlaga sýnatökuáætlunina (þ.e. einn hópur fiska við áætluð lok hreinsunarfasans og annar hópur eftir helming þess tíma).

— Notkun á tveimur prófunarstyrkleikum til að kanna hugsanlegt styrkhæði. Ef niðurstöður úr smækkaðri prófun, sem er gerð með tveimur prófunarstyrkleikum, sýna að lífþéttnistuðullinn er ekki styrkháður (þ.e. munurinn er undir 20%) má líta svo á að einn prófunarstyrkur dugi í heildarprófun, ef slík prófun er gerð.

— Líklegt er að hægt sé að nota líkön af ferlum uppsöfnunar í lífverum, s.s. þau sem Arnot o.fl. (35. heimild) leggja til, til aðstoðar við að áætla lengd upptöku- og hreinsunarfasa (sjá einnig 5. viðbæti).

Útreikningar

Rökin fyrir þessari aðferð eru að annað hvort sé hægt að ákvarða lífþéttnistuðul í heildarprófun sem lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) með því að reikna út hlutfallið milli styrks prófunarefnis í vef fisksins og styrks prófunarefnis í vatninu eða með því að reikna út lífþéttnihraðastuðul (BCF_K) sem hlutfall milli fasta fyrir upptökuhraða k_1 og hreinsunarhraðafasta k_2. Stuðull fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) er gildur þó að styrkur efnis við stöðugt ástand náist ekki meðan á upptöku stendur að því tilskildu að upptaka og hreinsun hegði sér að mestu samkvæmt ferlum hraðafræði af fyrstu gráðu. Gerð er krafa um tvo gagnapunkta að lágmarki til að meta upptöku- og hreinsunarhraðafasta, annan við lok upptökufasans (þ.e. við upphaf hreinsunarfasans) og hinn við lok (eða eftir umtalsverðan hluta) hreinsunarfasans. Mælt er með milliliggjandi sýnatökupunkti til að kanna hraðafræði upptöku og hreinsunar ([1]). Sjá útreikninga í 5. og 6. viðbæti.

Túlkun niðurstaðna

Til að meta gildi prófunarinnar og upplýsingagildi skal staðfesta að hreinsunartímabilið sé lengra en einn helmingunartími. Einnig skal bera lífþéttnihraðastuðul sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) saman við smækkað gildi lífþéttnistuðuls fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) (sem er sá BCF_{SS} sem er reiknaður við lok upptökufasans að því gefnu að stöðugt ástand hafi náðst. Þetta er einungis hægt að áætla þar eð fjöldi sýnatökupunkta er ekki nægur til að sanna þetta). Ef lífþéttnihraðastuðull sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) er < smækkaður lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (smækkaður BCF_{SS}) skal smækkaður lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (smækkaður BCF_{SS}) vera ákjósanlegt gildi. Ef lífþéttnihraðastuðull sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) er minni en 70% af smækkuðum lífþéttnistuðli fyrir stöðugt ástand (smækkaður BCF_{SS}) eru niðurstöðurnar ekki gildar og framkvæma skal heildarprófun.

Ef smækkuð prófun gefur lífþéttnihraðastuðul sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) sem er nálægt eftirlitsgildi sem gefur tilefni til áhyggna skal framkvæma heildarprófun. Ef niðurstöðurnar eru langt frá eftirlitsgildi sem gefur tilefni til áhyggna (vel yfir eða undir) er e.t.v. ekki nauðsynlegt að framkvæma heildarprófun eða þá að hægt er að framkvæma heildarprófun með einum styrk ef þess er krafist samkvæmt viðeigandi regluramma.

Ef heildarprófun reynist nauðsynleg eftir smækkaða prófun með einum styrk er hægt að framkvæma hana með öðrum styrk. Ef niðurstöðum ber saman er hægt að veita undanþágu frá frekari heildarprófun með öðrum styrk þar eð ekki er búist við að lífþéttni efnisins sé styrkháð. Ef smækkaða prófunin var framkvæmd með tveimur styrkleikum og niðurstöðurnar sýna ekkert styrkhæði má framkvæma heildarprófun með einungis einum styrk (sjá 87. lið).

([1]) Ef einungis tveir gagnapunktar eru mældir er hægt að meta öryggismörk fyrir lífþéttnihraðastuðul sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) með því að nota aðferðir með handahófsúrtakanálgun. Ef milliliggjandi gagnapunktar eru einnig tiltækir er hægt að reikna út öryggismörk fyrir lífþéttnihraðastuðul sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}), eins og í heildarprófuninni.

Prófunarskýrsla

Prófunarskýrslan um smækkaða prófun skal innihalda allar upplýsingar sem krafist er varðandi heildarprófun (sjá 81. lið), að undanskildu því sem ekki er unnt að fjalla um (þ.e. feril sem sýnir tímann þar til stöðugu ástandi er náð og lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}); að því er varðar það síðarnefnda skal í staðinn gefa upp smækkaðan lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand (smækkaður BCF_{SS}). Að auki skal hún einnig innihalda rökstuðning fyrir því að nota smækkuðu prófunina og lífþéttnihraðastuðulinn sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) sem af henni leiðir.

C.13 - III: **Prófun á uppsöfnun í fiskum við fæðutengd váhrif**

INNGANGUR

Nota skal aðferðina sem lýst er í þessum hluta fyrir efni sem aðferðir með vatnstengdum váhrifum henta ekki fyrir (t.d. vegna þess að ekki er hægt að viðhalda stöðugum, mælanlegum styrk í vatni eða ekki er hægt að ná fullnægjandi líkamsálagi innan 60 váhrifadaga; sjá fyrri hluta um aðferð með vatnstengdum váhrifum). Það skal þó tekið fram að endapunkturinn í þessari prófun verður fæðutengdur lífmögnunarstuðull (BMF) fremur en lífþéttnistuðull (BCF) ([1]).

Í maí 2001 var ný aðferð til prófunar á uppsöfnun í lífverum á lífrænum efnum sem eru torleysanleg í vatni kynnt á ráðstefnu SETAC Europe sem haldin var í Madrid (36. heimild). Þetta verkefni byggði á mismunandi rannsóknum á uppsöfnun í lífverum í heimildum þar sem notuð er skömmtunaraðferð með íbættu fóðri (t.d. 37. heimild). Snemma árs 2004 voru drög að aðferðarlýsingu (38. heimild), hönnuð til að mæla uppsöfnunargetu í lífverum með lífrænum efnum, torleysanlegum í vatni, sem stöðluð lífþéttniaðferð með váhrifum í vatni hentaði ekki fyrir, lögð fyrir starfshóp EU-PBT ásamt bakgrunnsskjali til stuðnings (39. heimild). Frekari rökstuðningur fyrir aðferðinni var sá að mögulegu umhverfisváhrifin af svo torleysanlegum efnum (*þ.e.* log K_{OW} >5) geti að mestu leyti verið með fæðunni (sjá 40.–44. heimild). Af þessum sökum er vísað til prófana á fæðutengdum váhrifum í nokkrum birtum reglugerðum um íðefni ([2]). Það skal þó tekið fram að í aðferðinni sem hér er lýst er þess vandlega gætt að forðast váhrif með vatnsfasa og þess vegna er ekki hægt að gera beinan samanburð á gildi lífmögnunarstuðuls (BMF) úr þessari prófunaraðferð og gildi lífmögnunarstuðuls (BMF) úr vettvangsrannsókn (þar sem hægt er að sameina vatns- og fæðutengd váhrif).

Þessi hluti núverandi prófunaraðferðar byggist á þessari aðferðarlýsingu (38. heimild) og er ný aðferð sem birtist ekki í fyrri útgáfu prófunaraðferðar C.13. Þessi staðgönguprófun gerir það kleift að rannsaka ferli fæðutengdra váhrifa beint við stýrð skilyrði á rannsóknarstofu.

Væntanlegir rannsakendur skulu fletta upp í 1.–14. lið þessarar prófunaraðferðar til að fá upplýsingar um hvort prófun á fæðutengdum váhrifum sé ákjósanlegri en prófun á vatnstengdum váhrifum. Þar eru settar fram upplýsingar um ýmis íhugunarefni varðandi efni og skal taka þau til athugunar áður en prófun er framkvæmd.

Hægt er að íhuga notkun á geislamerktum prófunarefnum og taka sömu atriði með í reikninginn og í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum (sjá 6. og 65. lið).

Hægt er að nota fæðutengdu aðferðina til að prófa fleiri en eitt efni í einni prófun svo fremi að tilteknar viðmiðanir séu uppfylltar; fjallað er nánar um þær í 112. lið. Til einföldunar lýsir aðferðafræðin hér prófun þar sem einungis er notað eitt prófunarefni.

Fæðutengd prófun er að mörgu leyti svipuð aðferðinni með vatnstengdum váhrifum nema váhrifaleiðin er augljóslega undantekningin þar á. Af þessum sökum skarast margir þættir í aðferðinni, sem hér er lýst, við aðferðina með vatnstengdum váhrifum sem er lýst í fyrri hluta. Settar eru inn millivísanir í viðeigandi liði í fyrri hluta, eins og kostur er, en í þágu læsileika og skilnings verður ekki komist hjá tilteknum endurtekningum.

([1]) Sjá skilgreiningar og einingar í 1. viðbæti.

([2]) Að því er varðar reglugerð (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglugerðin (REACH)) (Stjtíð. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1) er fjallað um þetta málefni í „Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment“, köflum R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1 og mynd R7.10–2.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Hægt er að nota gegnumstreymi eða hálfkyrrstöðuskilyrði (sjá 4. lið); mælt er með gegnumstreymisskilyrðum til að takmarka möguleg váhrif frá prófunarefninu með vatni sem leiða af afsogi frá íbættu fóðri eða saur. Prófunin samanstendur af tveimur fösum: upptöku (fóður með íbættu prófunarefni) og hreinsun (hreint, ómeðhöndlað fóður) (sjá 16. lið). Í upptökufasanum er prófunarhópur fiska fóðraður daglega á tilteknu fiskafóðri af þekktri samsetningu, sem fæst á almennum markaði, með íbættu prófunarefni. Fiskarnir skulu helst éta allt fóður sem er í boði (sjá 141. lið). Síðan eru fiskarnir fóðraðir á hreinu, ómeðhöndluðu fiskafóðri, sem fæst á almennum markaði, meðan hreinsunarfasinn stendur yfir. Eins og í aðferð með vatnstengdum váhrifum er hægt að nota fleiri en einn prófunarhóp með mismunandi styrkleikum íbætts prófunarefnis, ef nauðsyn krefur, en að því er varðar meirihluta lífrænna, mjög vatnsfælinna prófunarefna nægir einn prófunarhópur (sjá 49. og 107. lið). Ef hálfkyrrstöðuskilyrði eru notuð skal flytja fiskana í nýjan miðil og/eða nýtt prófunarker við lok upptökufasans (ef vera kynni að miðillinn og/eða búnaðurinn sem er notaður í upptökufasanum hafi mengast með útskolun af prófunarefninu). Styrkur prófunarefnisins í fiskunum er mældur í báðum fösum prófunarinnar. Auk fiskahópsins sem er fóðraður á íbættu fóðri (prófunarhópur) er samanburðarhópur fiska haldinn við nákvæmlega sömu skilyrði og fóðraður nákvæmlega eins að öðru leyti en því að prófunarefninu er ekki bætt í fiskafóðrið, sem fæst á almennum markaði. Þessi samanburðarhópur gerir kleift að magngreina bakgrunnsgildi prófunarefnisins í fiskum sem verða ekki fyrir váhrifum og gegnir hlutverki samanburðar m.t.t. allra meðhöndlunartengdra skaðlegra áhrifa sem vart verður við í prófunarhópun(um) ([1]). Hann gerir einnig kleift að bera saman vaxtarhraðafasta milli hópa til að fylgjast með því hvort svipað magn af fóðri í boði hafi verið étið (einnig skal íhuga mögulegan mun á bragðgæðum milli fóðurs þegar mismunandi vaxtarhraðafastar eru útskýrðir, sjá 138. lið). Mikilvægt er að prófunar- og samanburðarhópar fái næringarfræðilega jafngilt fóður, bæði í upptöku- og hreinsunarfösum.

Upptökufasi sem stendur í 7–14 daga er yfirleitt fullnægjandi, byggt á reynslu þeirra sem þróuðu aðferðina (38. og 39. heimild). Þessi tímalengd ætti að lágmarka kostnað við framkvæmd prófunarinnar en tryggja um leið nægileg váhrif af flestum efnum. Í einhverjum tilfellum er þó hægt að lengja upptökufasann (sjá 127. lið). Meðan á upptökufasanum stendur er ekki víst að styrkur efnisins í fiskunum nái stöðugu ástandi þannig að meðhöndlun gagna og niðurstöður úr þessari aðferð byggjast yfirleitt á hraðafræðilegri greiningu á leifum í vefjum. (Aths.: Hér má nota jöfnur til að áætla tíma þar til stöðugu ástandi er náð, eins og í prófuninni á vatnstengdum váhrifum, sjá 5. viðbæti). Hreinsunarfasi hefst þegar fiskarnir fá óíbætt fóður í fyrsta sinn og stendur alla jafna í allt að 28 daga eða þar til ekki er lengur hægt að magngreina prófunarefnið í heilum fiski, hvort heldur ber fyrr að. Hægt er að stytta hreinsunarfasann eða lengja hann fram yfir 28 daga, sem ræðst af breytingunum á mældum styrk íðefnis með tímanum og stærð fiska.

Þessi aðferð gerir kleift að ákvarða efnasértækan helmingunartíma ($t_{1/2}$, út frá hreinsunarhraðafastanum, k_2), aðlífunargetu (frásog í þörmum, α), fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_K), vaxtarleiðréttan fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{Kg}) og fituefnaleiðréttan ([2]) fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{KL}) (og/eða fituefna- og vaxtarleiðréttan fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{KgL})) fyrir prófunarefnið í fiskunum. Eins og í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum mun þyngdaraukning fiska meðan á prófuninni stendur leiða til þynningar prófunarefnisins í fiski sem er að vaxa og þess vegna verður (hraðafræðilegur) lífmögnunarstuðull (BMF) vanmetinn ef hann er ekki leiðréttur m.t.t. vaxtar (sjá 162. og 163. lið). Ef áætlað er að stöðugt ástand hafi náðst í upptökufasanum er að auki hægt að reikna út leiðbeinandi lífmögnunarstuðul (BMF) fyrir stöðugt ástand. Til eru aðferðir sem gera það kleift að meta stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) út frá gögnum sem fást úr fóðurrannsókninni (t.d. 44.–48. heimild). Fjallað er um kosti og galla slíkra aðferða í 8. viðbæti.

Prófunin var upphaflega hönnuð fyrir torleysanleg, óskautuð lífræn efni sem fylgja að mestu hraðafræði upptöku og hreinsunar af fyrstu gráðu í fiskum. Ef prófað er efni sem fylgir ekki að mestu hraðafræði upptöku og hreinsunar af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (sjá heimildir í 5. viðbæti) og leita ráða hjá líftölfræðingi og/eða lyfjahvarfafræðingi.

([1]) Að því er varðar flest prófunarefni er ákjósanlegast að þau greinist ekki í samanburðarvatninu. Bakgrunnsstyrkur ætti einungis að skipta máli varðandi efni sem koma fyrir frá náttúrunnar hendi (t.d. sumir málmar) og efni sem eru alls staðar í umhverfinu.

([2]) Þar eð lífmögnunarstuðull (BMF) er skilgreindur sem hlutfallið milli styrks efnis í lífveru og styrks í fæðu lífverunnar við stöðugt ástand er tekið tillit til fituefna með leiðréttingu fyrir fituefnainnihald í lífverunni og í fæðunni og af þessum sökum er nákvæmara að lýsa þessu sem „leiðréttingu“. Þessi aðferð er ólík „stöðlun“ samkvæmt fastsettu fituefnainnihaldi lífveru eins og gert er í prófun á lífþéttni við vatnstengd váhrif.

Lífmögnunarstuðullinn (BMF) er yfirleitt ákvarðaður með því að nota greiningu á prófunarefni í heilum fiski (á grundvelli blautvigtar). Ef það skiptir máli fyrir markmið rannsóknarinnar er hægt að taka sýni úr sérstökum vefjum (t.d. vöðva, lifur) ef fiskinum er skipt í æta og óæta hluta (sjá 21. lið). Enn fremur er hægt að fjarlægja meltingarveginn og gera sérstaka greiningu á honum til að ákvarða hlutdeild hans í styrknum í öllum fiskinum á sýnatökupunktum, í lok upptökufasans og nálægt upphafi hreinsunarfasans, eða sem hluta af massajöfnuðaraðferð.

Fituefnainnihald í heilum fiski, sem sýni er tekið úr, skal mælt svo unnt sé að fituefnaleiðrétta styrkinn, að teknu tilliti til fituefnainnihalds í bæði fóðrinu og fiskinum (sjá 56. og 57. lið og 7. viðbæti).

Vega skal einstaka fiska, sem sýni er tekið úr, og skrá þyngdina og tengja hana við greindan styrk íðefnis í viðkomandi fiski (t.d. sett fram með því að nota einkvæman auðkenniskóða fyrir hvern fisk sem sýni er tekið úr) í þeim tilgangi að reikna út vöxt sem getur orðið meðan prófunin stendur yfir. Einnig skal mæla heildarlengd fisksins þegar unnt er ([1]). Gögn um þyngd eru einnig nauðsynleg til að meta lífþéttnistuðul með því að nota gögn úr hreinsun úr fæðutengdu prófuninni.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Upplýsingar um prófunarefnið, eins og lýst er í 3. og 22. lið, skulu liggja fyrir. Aðferð til að greina styrk prófunarefnis í vatni er alla jafna ekki nauðsynleg; gerð er krafa um aðferðir með hentugt næmi til að mæla styrk í fiskafóðri og fiskvefjum.

Hægt er að nota aðferðina til að prófa fleiri en eitt efni í einni prófun. Þó skulu prófunarefni vera samhæfð hvert við annað þannig að ekki verði víxlverkun eða breyting á efnakenni þeirra þegar þeim er bætt í fiskafóðrið. Markmiðið er að ekki sé mikill munur á mældum niðurstöðum fyrir hvert efni sem prófað er með öðru efni og þeim niðurstöðum sem koma fram ef keyrð hefur verið sérstök prófun á hvert prófunarefni. Forgreiningarvinna skal sýna fram á að hægt sé að endurheimta hvert efni úr sýni úr fóðri, sem mörgum efnum hefur verið bætt í, og fiskvefjum með i. mikilli endurheimt (t.d. > 85% af nafngildi) og ii. því næmi sem þarf fyrir prófunina. Heildarskammtur efna sem eru prófuð saman skal vera undir samanlögðum styrk sem getur valdið eiturhrifum (sjá 51. lið). Við tilhögun tilraunar skal enn fremur taka tillit til mögulegra skaðlegra áhrifa á fiska og möguleika á gagnvirkum áhrifum (t.d. efnaskiptaáhrifum) sem tengjast því að prófa mörg efni samtímis. Forðast skal að prófa samtímis efni sem geta jónast. Með tilliti til váhrifa hentar aðferðin einnig fyrir flóknar efnablöndur (sjá 13. lið þó að sömu takmarkanir við greiningu eigi við og gilda um aðrar aðferðir).

GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt (sjá 24. lið):

— Mismunur á vatnshitastigi er minni en ± 2 °C í meðhöndlunar- eða samanburðarhópum.

— Styrkur uppleysts súrefnis fer ekki undir 60% af mettunargildi lofts.

— Styrkur prófunarefnis í fiskafóðri fyrir og við lok upptökufasans er innan bils sem nemur ± 20% (byggt á a.m.k. þremur sýnum á báðum tímapunktum).

— Sýna skal fram á mikla einsleitni efnis í fæðu í forgreiningarvinnu á íbætta fóðrinu; breytileiki styrks í a.m.k. þremur sýnum með efninu, sem tekin eru við upphaf prófunarinnar, má ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu.

([1]) Einnig skal skrá heildarlengd meðan prófunin stendur yfir þar eð hún er góð vísbending um hvort skaðleg áhrif hafi orðið.

— Styrkleikar prófunarefnis greinast ekki, eða eru einungis til staðar í dæmigerðu snefilmagni, í óíbættu fóðri eða í vef samanburðarfiska miðað við meðhöndluð sýni.

— Dánartíðni eða önnur skaðleg áhrif/sjúkdómar, bæði í samanburðarhóp fiska og prófunarhóp, skal vera ≤ 10% við lok prófunar; ef prófunin er af einhverjum ástæðum framlengd skulu skaðleg áhrif í báðum hópum vera ≤ 5% á mánuði og ≤ 30% uppsöfnuð. Marktækur munur á meðaltalsvexti milli prófunarhópa og samanburðarhópa fiska sem sýni er tekið úr gæti bent til eiturhrifa prófunarefnisins.

VIÐMIÐUNAREFNI

Ef rannsóknarstofa hefur ekki framkvæmt rannsóknina áður eða ef umtalsverðar breytingar (t.d. breytingar á fiskstofni eða birgi, önnur fisktegund, verulegar breytingar á stærð fiska, fiskafóðri eða íbætingaraðferð o.s.frv.) hafa verið gerðar er ráðlegt að framkvæma rannsókn á tæknilegri hæfni með því að nota viðmiðunarefni. Viðmiðunarefni er fyrst og fremst notað til að ganga úr skugga um hvort tækni við íbætingu í fæðu er fullnægjandi til að tryggja hámarkseinsleitni og lífaðgengi prófunarefna. Dæmi um efni, sem hefur verið notað ef um er að ræða óskautuð vatnsfælin efni, er hexaklórbensen (HCB) en íhuga skal að nota önnur efni, sem áreiðanleg gögn um upptöku og lífmögnun eru til um, sökum hættulegra eiginleika hexaklórbensens ([1]). Ef viðmiðunarefni eru notuð skal leggja fram grunnupplýsingar um þau í prófunarskýrslunni, þ.m.t. heiti, hreinleiki, CAS-númer, uppbygging, gögn um eiturhrif (ef þau eru tiltæk), á sama hátt og fyrir prófunarefni (sjá 3. og 22. lið).

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

Nota skal efni og búnað eins og lýst er í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum (sjá 26. lið). Nota skal prófunarkerfi með gegnumstreymi eða kyrrstöðu með endurnýjun sem veitir fullnægjandi magni þynningarvatns yfir í prófunarílátin. Streymið skal skráð.

Vatn

Nota skal prófunarvatn eins og lýst er í aðferðinni með vatnstengd váhrif (sjá 27.–29. lið). Eiginleikar prófunarmiðilsins skulu vera eins og lýst er og gæði hans haldast stöðug meðan á prófuninni stendur. Náttúrulegt innihald agna og heildarmagn lífræns kolefnis skal vera eins lítið og unnt er (≤ 5 mg/l efnisagnir; ≤ 2 mg/l heildarmagn lífræns kolefnis) áður en prófun hefst. Einungis er þörf á mæla heildarmagn lífræns kolefnis fyrir prófunina sem hluta af lýsingu á eiginleikum prófunarvatnsins (sjá 53. lið).

Fóður

Mælt er með fiskafóðri sem fæst á almennum markaði (fljótandi fóðurkögglar og/eða fóðurkögglar sem sökkva hægt) þar sem eiginleikum er a.m.k. lýst m.t.t. prótín- og fituinnihalds. Stærð kögglanna í fóðrinu skal vera einsleit til að auka skilvirkni fóðurváhrifanna, þ.e. fiskurinn étur meira af fóðrinu í stað þess að hann éti stærri bitana og láti þá minni eiga sig. Kögglarnir skulu vera af heppilegri stærð miðað við stærð fiskanna við upphaf prófunarinnar (þ.e. nota má köggla sem eru u.þ.b. 0,6–0,85 mm að ummáli fyrir fiska af heildarlengd á bilinu 3–7 cm og 0,85–1,2 mm fyrir fiska af heildarlengd á bilinu 6–12 cm). Hægt er að aðlaga kögglastærð að vexti fiskanna við upphaf hreinsunarfasans. Dæmi um heppilega samsetningu fóðurs, sem fæst á almennum markaði, er að finna í 7. viðbæti. Prófunarfóður með heildarfituefnainnihald á bilinu 15–20% (massahlutfall) var almennt notað við þróun þessarar aðferðar. Fiskafóður með svona háan fituefnastyrk er e.t.v. ekki fáanlegt á sumum svæðum. Í slíkum tilvikum er hægt að keyra rannsóknir með fóðri sem inniheldur lægri fituefnastyrk og, ef nauðsyn krefur, aðlaga fóðrunarhlutfallið til samræmis við það til að viðhalda heilbrigði fiskanna (byggt á forprófun). Mæla þarf og skrá heildarfituefnainnihaldið í fóðri prófunar- og samanburðarhóps áður en prófunin hefst og við lok upptökufasans. Nánari upplýsingar frá birgi fóðursins, sem fæst á almennum markaði, um næringarefni, raka, trefjar og ösku og, ef unnt er, steinefni og varnarefnaleifar (t.d. „stöðluð“ forgangsmengunarefni) skulu koma fram í rannsóknarskýrslunni.

([1]) Hexaklórbensen er tilgreint í viðaukum A og C við Stokkhólmssamninginn og í I. og III. viðauka við reglugerð (EB) nr. 850/2004 um þrávirk, lífræn mengunarefni (Stjtíð. ESB L 158, 30.4.2004, bls. 7).

Þegar prófunarefni er bætt í fóðrið skal leitast við af fremsta megni að tryggja einsleitni í öllu prófunarfóðrinu. Styrkur prófunarefnis í fóðrinu fyrir prófunarhópinn skal valinn með tilliti til næmi greiningartækninnar, eiturhrifa prófunarefnisins (styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, ef hann er þekktur) og viðeigandi eðlisefnafræðilegra gagna. Ef viðmiðunarefni er notað er ákjósanlegast að það sé sett í fóðrið í styrk sem nemur u.þ.b. 10% af styrk prófunarefnisins (í öllum tilvikum skal hann vera eins lítill og unnt er), háð greiningarnæmi (að því er varðar hexaklórbensen hefur t.d. styrkur sem nemur 1–100 µg/g í fóðrinu reynst fullnægjandi; sjá 47. heimild varðandi meiri upplýsingar um aðlífunargetu hexaklórbensens).

Hægt er að bæta prófunarefninu í fiskafóðrið á ýmsan hátt, með hliðsjón af eðliseiginleikum þess og leysni (sjá nánari upplýsingar um íbætingaraðferðir í 7. viðbæti):

— ef efnið er uppleysanlegt og stöðugt í þríglýseríðum skal leysa það upp í litlu magni af fisklýsi eða ætri jurtaolíu áður en því er blandað saman við fiskafóðrið. Í þessu tilviki skal forðast að mynda skammt sem inniheldur of mikið af fituefnum, að teknu tilliti til náttúrulegs fituefnainnihalds íbætta fóðursins, með því að bæta við því lágmarksmagni af olíu sem vitað er að þurfti til að ná fram dreifingu og einsleitni prófunarefnisins í fóðrinu eða,

— bæta skal hentugum lífrænum leysi í fóðrið svo fremi að einsleitni og lífaðgengi sé ekki stefnt í hættu (mögulegt er að (ör)kristallar prófunarefnisins myndist í fóðrinu vegna uppgufunar leysisins og engin auðveld aðferð er til að sanna að þetta hafi ekki gerst (sjá 49. heimild)) eða,

— bæta skal vökvum, sem eru ekki seigfljótandi, beint í fiskafóðrið en þeir skulu vera vel blandaðir til að stuðla að einsleitni og auðvelda góða aðlífun. Tækni til blöndunar skal tryggja einsleitni íbætta fóðursins.

Í nokkrum tilvikum, t.d. þar sem prófunarefni sem eru minna vatnsfælin eru líklegri til að afsogast frá fóðrinu, getur reynst nauðsynlegt að húða tilbúna fóðurköggla með litlu magni af maísolíu/fisklýsi (sjá 142. lið). Í slíkum tilvikum skal meðhöndla samanburðarfóður á sama hátt og endanlega, tilreidda fóðrið sem er notað til að fituefnamælinga.

Ef viðmiðunarefni er notað ættu niðurstöður varðandi það að vera í samræmi við gögn úr heimildum um rannsóknir sem fara fram við svipuð skilyrði með svipuðu fóðrunarhlutfalli (sjá 45. lið) og sérstakir mæliþættir viðmiðunarefna skulu uppfylla viðkomandi viðmiðanir í 113. lið (3.– 5. liður).

Ef notuð er olía eða leysir sem burðarefni fyrir prófunarefni skal blanda sama magni af sama burðarefni (að undanskildu prófunarefni) saman við samanburðarfóðrið til að viðhalda jafngildi við íbætta fóðrið. Mikilvægt er að prófunar- og samanburðarhópar fái næringarfræðilega jafngilt fóður, bæði í upptöku- og hreinsunarfösum.

Íbætta fóðrið skal geymt við skilyrði sem viðhalda stöðugleika prófunarefnisins í fóðurblöndunni (t.d. í kæli) og gera skal grein fyrir þessum skilyrðum.

Val á fisktegund

Hægt er að nota fisktegundir sem eru tilgreindar fyrir vatnstengd váhrif (sjá 32. lið og 3. viðbæti). Regnbogasilungur (*Oncorhynchus mykiss*), vatnakarpi (*Cyprinus carpio*) og breiðkollur (*Pimephales promelas*) voru almennt notaðir í rannsóknum á fæðutengdri uppsöfnun í lífverum með lífrænum efnum áður en þessi prófunaraðferð var birt. Hegðun prófunartegundarinnar við fóðurát skal vera þannig að hún éti gefna fóðurskammta hratt til að tryggja að öllum þáttum sem hafa áhrif á styrk prófunarefnisins í fóðri (t.d. útskolun í vatnið og möguleiki á vatnstengdum váhrifum) sé haldið í lágmarki. Nota skal fisk af þeirri stærð/þyngd sem mælt er með (sjá 3. viðbæti). Fiskarnir mega ekki vera það litlir að það hamli auðvelda greiningu á hverjum fyrir sig. Tegundir, sem eru prófaðar á lífsstigi meðan þær vaxa hratt, geta flækt túlkun gagna og mikill vöxtur getur haft áhrif á útreikning á aðlífunargetu ([1]).

([1]) Ef vöxturinn er hraður meðan á upptökufasanum stendur mun raunverulegt fóðrunarhlutfall minnka og verða minna en það sem er ákvarðað við upphaf váhrifa.

Eldi fisksins

Aðlögun, dánartíðni og sjúkdómssamþykktarviðmiðanir eru þær sömu og í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum áður en prófunin er framkvæmd (sjá 33.–35. lið).

FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

Forrannsóknarvinna og skammtastærðarrannsókn

Forrannsóknargreiningarvinna er nauðsynleg til að sýna fram á endurheimt efnisins úr íbættu fóðri/ fiskvefjum. Skammtastærðarrannsókn til að velja heppilegan styrk í fóðrinu er ekki alltaf nauðsynleg. Hægt er að framkvæma fortilraun með fóðri í þeim tilgangi að sýna fram á að engin skaðleg áhrif komi í ljós og til að meta bragðgæði íbætts fóðurs, næmi aðferða til að gera greiningar á fiskvefjum og fóðri og val á heppilegu fóðrunarhlutfalli og sýnatökumillibili meðan á hreinsunarfasanum stendur o.s.frv., en það er ekki skyldubundið. Forrannsókn getur verið mikilvæg til að áætla fjölda fiska sem þarf að taka sýni úr meðan hreinsunarfasi stendur yfir. Þetta getur leitt til marktækrar fækkunar á fiskum sem eru notaðir, einkum að því er varðar prófunarefni sem eru sérlega næm m.t.t. efnaskipta.

Váhrifaskilyrði

Tímalengd upptökufasa

Upptökufasi í 7–14 daga nægir venjulega en meðan hann stendur yfir er hópur fiska fóðraður daglega á tilteknum skammti af samanburðarfóðri og annar hópur fiska á prófunarfóðri, háð tegundum sem eru prófaðar og tilraunaskilyrðum, t.d. á bilinu 1–2% líkamsþyngdar (blautvigt) ef um er að ræða regnbogasilung. Fóðrunarhlutfallið skal valið þannig að komið sé í veg fyrir hraðan vöxt og mikla aukningu fituefnainnihalds. Ef þörf krefur er hægt að lengja upptökufasann, byggt á fenginni reynslu úr fyrri rannsóknum eða þekkingu á upptöku/hreinsun prófunarefnisins (eða hliðstæðu efni) í fiski. Upphaf prófunarinnar er skilgreint sem fyrsta fóðrun með íbættu fóðri. Tilraunadagur stendur yfir frá þeim tímapunkti þegar fóðrað er þar til skömmu áður en fóðrað er næst (t.d. klukkustund). Fyrsti tilraunadagur upptöku stendur þ.a.l. yfir frá því að fyrst er fóðrað með íbættu fóðri og lýkur skömmu áður en fóðrað er í annað sinn með íbættu fóðri. Í raun endar upptökufasinn skömmu áður (t.d. einni klukkustund) en fóðrað er með óíbættu prófunarefni í fyrsta sinn því fiskarnir halda áfram að melta íbætt fóður og frásoga prófunarefnið á næstu 24 klst. Mikilvægt er að tryggja að nægilega mikið (án eitrunar) álag á líkamann af völdum prófunarefnisins náist, með hliðsjón af greiningaraðferðinni, þannig að a.m.k. sé hægt að mæla tugaþrepslækkun meðan hreinsunarfasinn stendur yfir. Í sérstökum tilvikum er hægt að nota framlengdan upptökufasa (allt að 28 daga) með viðbótarsýnatöku til að fá innsýn í hraðafræði upptöku. Meðan á upptöku stendur nær styrkur í fiskunum e.t.v. ekki stöðugu ástandi. Hér má nota jöfnur, eins og í prófuninni á vatnstengdum váhrifum, til að áætla tíma þar til stöðugu ástandi er náð sem vísbendingu um líklega tímalengd sem þarf til að ná greinilegum styrk í fiskum (sjá 5. viðbæti).

Í sumum tilvikum kann að vera að upptaka efnis í fiskum á 7–14 dögum sé ekki nægileg til að styrkur fóðursins sem er notað nái nægum styrk í fiskunum til að hægt sé að greina a.m.k. tugaþrepslækkun meðan á hreinsun stendur, annað hvort vegna lélegs greiningarnæmis eða lítillar aðlífunargetu. Í slíkum tilvikum getur verið hagkvæmt að framlengja upphaflegan fóðrunarfasa svo hann verði lengri en 14 dagar eða, einkum að því er varðar efni sem breytast auðveldlega með efnaskiptum, taka til athugunar að nota hærri styrk í fóðrinu. Þó skal þess gætt að halda líkamsálagi meðan á upptöku stendur undir (áætluðum) langvinnum styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) í fiskvefjum (sjá 138. lið).

Lengd hreinsunarfasa

Hreinsun stendur alla jafna í allt að 28 daga og hefst um leið og prófunarhópur fiska er fóðraður á hreinu, ómeðhöndluðu fóðri eftir upptökufasann. Hreinsun hefst við fyrstu fóðrun með „óíbættu“ fóðri fremur en strax eftir að síðasta „íbætta“ fóðrið er gefið þar eð fiskarnir halda áfram að melta fóðrið og frásoga prófunarefnið á næstu 24 klst., eins og fram kemur í 126. lið. Því skal fyrsta sýnið í hreinsunarfasanum tekið skömmu fyrir aðra fóðrun með óíbættu fóðri. Þessu hreinsunartímabili er ætlað að ná efnum með hugsanlegan helmingunartíma sem nemur allt að 14 dögum, sem er í samræmi við það sem gerist hjá efnum sem safnast fyrir í lífverum ([1]), þannig að 28 dagar eru tveir helmingunartímar slíkra efna. Þegar um er að ræða efni sem safnast fyrir í miklum mæli í lífverum getur verið hagkvæmt að framlengja hreinsunarfasann (ef forprófun bendir til þess).

Ef efni hreinsast mjög hægt þannig að ekki er unnt að ákvarða nákvæman helmingunartíma í hreinsunarfasanum geta upplýsingarnar samt verið fullnægjandi til að meta hvort vísbendingar eru um mikla uppsöfnun í lífverum. Ef efni hreinsast það hratt að ekki er hægt að leiða út áreiðanlegan styrk á tímapunkti núll (styrkleiki við lok upptöku/upphaf hreinsunar, $C_{0,d}$) og k_2,er hægt að gera varfærnislegt mat á k_2 (sjá 7. viðbæti).

Ef greiningar á fiskum á fyrri tímabilum (t.d. eftir 7 eða 14 daga) sýna að efnið hefur hreinsast undir magngreiningargildi áður en allt 28 daga tímabilið er liðið má sleppa síðari sýnatökum og stöðva prófunina.

Í einhverjum tilvikum hefur e.t.v. engin mælanleg upptaka orðið á prófunarefninu við lok upptökutímabilsins (eða í sýni tvö úr hreinsun). Ef hægt er að sýna fram á að i. gildisviðmiðanirnar í 113. lið séu uppfylltar og ii. að skortur á upptöku stafi ekki af öðrum galla í prófuninni (t.d. að upptökutímabilið er ekki nógu langt, galla á tækni til íbætingar í fóðrið sem leiðir til lélegs lífaðgengis, greiningaraðferðin er ekki nógu næm, fiskurinn étur ekki fóðrið o.s.frv.) er hægt að stöðva rannsóknina án þess að það þurfi að keyra hana aftur með lengra upptökutímabili. Ef forvinna gefur til kynna að þetta kunni að eiga við getur verið ráðlegt að gera greiningar á saur, ef unnt er, m.t.t. ómelts prófunarefnis, sem hluta af massajöfnuðaraðferð.

Fjöldi prófunarfiska

Á sama hátt og í prófun á vatnstengdum váhrifum skal velja saman fiska af svipaðri þyngd og lengd þar sem smæstu fiskarnir eru ekki undir tveimur þriðju af þyngd þeirra stærstu (sjá 40.–42. lið).

Velja skal heildarfjölda fiska í rannsóknina á grundvelli sýnatökuáætlunar (a.m.k. eitt sýni við lok upptökufasans og fjögur til sex sýni meðan hreinsunarfasinn stendur yfir en háð tímalengd fasanna), að teknu tilliti til næmis greiningaraðferðarinnar, styrks sem líklegt er að náist við lok upptökufasans (byggt á fyrri þekkingu) og tímalengd hreinsunar (ef fyrirliggjandi þekking gerir kleift að áætla það). Taka skal sýni úr fimm til tíu fiskum í hvert skipti og mæla vaxtarbreytur (þyngd og heildarlengd) áður en efnagreining eða greining á fituefnum er framkvæmd.

Vegna eðlislægs breytileika í stærð, vaxtarhraða og lífeðlisfræði meðal fiskanna og líklegra frávika í magni fóðurs sem er gefið, sem hver fiskur étur, skal taka sýni úr a.m.k. fimm fiskum úr prófunarhópnum eftir hvert tímabil og fimm úr samanburðarhópnum til að ákvarða meðalstyrk og breytileika hans á fullnægjandi hátt. Breytileiki meðal fiskanna, sem eru notaðir, er líklegur til að stuðla meira að óviðráðanlegum heildarbreytileika í prófuninni en eðlislægur breytileiki í þeim greiningaraðferðum sem eru notaðar og þannig er réttlætanlegt að nota í sumum tilvikum allt að tíu fiska í hverjum sýnatökupunkti. Ef bakgrunnsstyrkur prófunarefnis í samanburðarfiski er ekki mælanlegur við upphaf hreinsunar getur þó verið nóg að gera efnagreiningu á tveimur þriðju af samanburðarfiskunum í síðustu sýnatökunni, svo fremi að tekin séu sýni, m.t.t. þyngdar og heildarlengdar, úr samanburðarfiskum sem eftir eru á öllum sýnatökupunktum (þannig að tekin séu sýni úr sama fjölda í prófunar- og samanburðarhópum m.t.t. vaxtar). Fiskar skulu geymdir, vegnir hver fyrir sig (jafnvel þó að það reynist nauðsynlegt að sameina síðan niðurstöður úr sýnum) og heildarlengdin mæld.

([1]) Í rannsókn á vatnstengdum váhrifum myndi 14 daga helmingunartími svara til lífþéttnistuðuls sem nemur ca 10 000 L/kg með því að nota fiska sem eru 1 g með samsvarandi upptökuhraða sem nemur u.þ.b. 500 L/kg/d (samkvæmt jöfnu Sijm *et al* (46. heimild)).

Að því er varðar staðlaða prófun með t.d. 28 daga hreinsunartíma með fimm hreinsunarsýnum merkir þetta 59–120 fiska alls úr prófuninni og 50–110 úr samanburðarhópum, að því gefnu að tæknin til að greina efnið geri það kleift að framkvæma greiningu á fituefnainnihaldi í sömu fiskum. Ef ekki er hægt að framkvæma greiningu á fituefnum á sömu fiskum og efnagreining er gerð á og ef ekki er heldur mögulegt að nota samanburðarfiska einungis til fituefnagreiningar (sjá 56. lið) er þörf á 15 fiskum til viðbótar (þremur úr stofnþýði við upphaf prófunar, þremur úr hvorum samanburðar- og prófunarhóp fyrir sig við upphaf hreinsunar og þremur úr hvorum samanburðar- og prófunarhóp fyrir sig við lok tilraunar). Dæmi um sýnatökuáætlun, með fjölda fiska, er að finna í 4. viðbæti.

Hleðsla

Nota skal svipað hlutfall fiska og vatns og notað er í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum (sjá 43. og 44. lið). Þó að hleðsluhlutfall fiska og vatns hafi ekki áhrif á váhrifastyrk í þessari prófun er mælt með hleðsluhlutfalli sem nemur 0,1–1,0 g af fiski (blautvigt) á hvern lítra vatns á dag til að viðhalda fullnægjandi styrk uppleysts súrefnis og lágmarka álag á prófunarlífverurnar.

Prófunarfóður og fóðrun

Meðan á aðlögunartímabilinu stendur skal fóðra fiskana á viðeigandi fóðri eins og lýst er hér að framan (117. liður). Ef prófunin er gerð við gegnumstreymisskilyrði skal stöðva streymið tímabundið meðan fiskarnir eru fóðraðir.

Meðan á prófuninni stendur skal fóður prófunarhópsins vera í samræmi við það sem lýst er hér að framan (116.–121. liður). Til viðbótar við atriði sem snerta efnasértæka þætti, greiningarnæmi, væntanlegan styrk í fóðrinu við umhverfisaðstæður og langvinn eiturhrifagildi/líkamsálag skal, við val á völdum styrk íbótarinnar, taka tillit til bragðgæða fóðursins (svo fiskarnir komi sér ekki hjá því að éta). Nafnstyrkur íbótar í prófunarefnið skal skráður í skýrsluna. Reynslan sýnir að íbótarstyrkur á bilinu 1–1 000 µg/g veitir hagnýtt mælisvið fyrir prófunarefni sem sýna ekki sérstakt gangvirki eiturhrifa. Að því er varðar efni sem virka með ósértæku gangvirki skulu efnaleifar í vef ekki fara yfir 5 µmol/g af fituefni þar sem leifar yfir þessu gildi eru líklegar til að skapa langvinn áhrif (19., 48. og 50. heimild) ([1]). Að því er varðar önnur efni skal þess gætt að engin skaðleg áhrif verði af uppsöfnuðum váhrifum (sjá 127. lið). Þetta á einkum við ef verið er að prófa fleiri en eitt efni á sama tíma (sjá 112. lið).

Hægt er að bæta viðeigandi magni prófunarefnisins í fiskafóðrið á þrjá vegu eins og lýst er í 119. lið og 7. viðbæti. Skrá skal aðferðir og verklag við íbætingu í fóður í skýrsluna. Samanburðarhópurinn er fóðraður á ómeðhöndluðu fóðri sem inniheldur sama magn af óíbættri olíu sem burðarefni, ef hún hefur verið notuð í íbætta fóðrið fyrir upptökufasann, eða sem hefur verið meðhöndlað með hreinum leysi ef leysir var notaður sem burðarefni við tilreiðslu fóðurs fyrir prófunarhópinn. Gera skal a.m.k. þrjár greiningarmælingar á meðhöndluðu og ómeðhöndluðu fóðri m.t.t. styrks prófunarefnisins fyrir upphaf upptökufasans og við lok hans. Eftir að fiskarnir hafa orðið fyrir váhrifum af meðhöndlaða fóðrinu (upptökufasinn) eru þeir (báðir hópar) fóðraðir á ómeðhöndluðu fóðri (hreinsunarfasi).

Fiskarnir eru fóðraðir á tilteknum skammti (fer eftir tegundum; til dæmis u.þ.b. 1–2% af líkamsþyngd (blautvigt) á dag ef um er að ræða regnbogasilung). Fóðrunarhlutfallið skal valið þannig að komið sé í veg fyrir hraðan vöxt og mikla aukningu fituefnainnihalds. Nákvæmt fóðrunarhlutfall, sem er ákvarðað fyrir alla tilraunina, skal skráð. Upphafleg fóðrun skal byggjast á þyngdarmælingunum á stofnþýðinu sem eru í áætluninni rétt fyrir upphaf prófunarinnar. Magn fóðurs skal aðlagað, byggt á blautvigt fiska sem sýni er tekið úr, við hverja sýnatöku til að gera ráð fyrir vexti meðan tilraunin stendur yfir. Hægt er að áætla þyngd og lengd fiska í prófunar- og samanburðarílátum út frá þyngd og heildarlengd fiska sem eru notaðir í hverri sýnatöku; ekki skal vega eða mæla fiska sem eftir eru í prófunar- og samanburðarílátum. Mikilvægt er að viðhalda fastsettu fóðrunarhlutfalli í allri tilrauninni.

([1]) Þar eð einungis er hægt að ákvarða raunverulegan innri styrk eftir að prófunin hefur verið framkvæmd er þörf fyrir mat á væntum innri styrk (t.d. byggt á lífmögnunarstuðli (BMF) sem búist er við og styrknum í fóðrinu; sjá jöfnu A5.8 í 5. viðbæti).

Fylgjast skal með fóðrun til að tryggja að fiskarnir éti allt fóður sem þeim er gefið til að öruggt sé að viðeigandi inntökuhlutföll séu notuð í útreikningum. Hafa skal fortilraunir með fóðri eða fyrri reynslu í huga við val á fóðrunarhlutfalli sem mun tryggja að allt fóður, sem gefið er einu sinni á dag, sé étið. Ef fóður er reglulega skilið eftir óétið gæti verið ráðlegt að dreifa skammtinum yfir á auka fóðrunartímabil á hverjum tilraunadegi (t.d. í stað þess að gefa einu sinni á dag að gefa þá gefa hálfan skammt tvisvar á dag). Ef þetta er nauðsynlegt skal seinni fóðrunin fara fram á tilsettum tímapunkti og tímasett þannig að eins langur tími og unnt er líði fram að því að sýni eru tekin úr fiskunum (t.d. fer seinni fóðrunin fram á fyrri helmingi tilraunadagsins).

Þó að fiskarnir séu alla jafna fljótir að éta fóðrið er mikilvægt að tryggja að efnið haldist ásogað við fóðrið. Forðast skal að prófunarefnið dreifist úr fóðrinu og í vatnið og að fiskarnir verði þannig fyrir váhrifum af styrk prófunarefnisins í vatninu til viðbótar við fæðutengdu leiðina. Þessu er hægt að ná fram með því að fjarlægja allt óétið fóður (og saur) úr prófunar- og samanburðarílátum innan klukkustundar frá fóðrun en helst innan 30 mínútna. Að auki er hægt að nota kerfi þar sem vatnið er hreinsað stöðugt gegnum síu með virkum kolefnum til að frásoga öll uppleyst aðskotaefni. Gegnumstreymiskerfi geta komið að gagni við að skola fljótt burt fóðurögnum og uppleystum efnum ([1]). Í sumum tilvikum getur örlítið breytt tækni við tilreiðslu á íbættu fóðri komið að gagni við að minnka þetta vandamál (sjá 119. lið).

Ljós og hiti

Eins og í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum (sjá 48. lið) er mælt með 12 til 16 klst. ljóslotu og hitastigi (± 2 °C) sem hentar prófunartegundunum sem eru notaðar (sjá 3. viðbæti). Tegund og einkenni lýsingar skulu vera þekkt og skráð.

Samanburðir

Nota skal einn samanburðarhóp af fiskum sem eru fóðraðir með sama skammti og prófunarhópurinn en án prófunarefnisins í fóðrinu. Ef olía eða leysir var notaður sem burðarefni til íbætingar í fóðrið í prófunarhópnum skal meðhöndla samanburðarhópinn á nákvæmlega sama hátt en án prófunarefnisins þannig að fóður prófunar- og samanburðarhóps sé eins (sjá 121. og 139. lið).

Tíðni mælinga á vatnsgæðum

Skilyrðin, sem lýst er í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum, eiga einnig við hér að því undanskildu að einungis þarf að mæla heildarmagn lífræns kolefnis fyrir prófunina sem hluta af lýsingu á eiginleikum prófunarvatnsins (sjá 53. lið).

Sýnataka og greining á fiski og fóðri

Greining fóðursýna

Gera skal a.m.k. þrjár greiningar á sýnum úr prófunar- og samanburðarfóðri m.t.t. prófunarefnisins og m.t.t. fituefnainnihalds, a.m.k. áður en upptökufastinn hefst og við lok hans. Greiningaraðferðir og verklag til að tryggja einsleitni fóðursins skulu koma fram í skýrslunni.

([1]) Ef til vill er ekki að öllu leyti hægt að komast hjá því að prófunarefnið sé fyrir hendi í prófunarmiðlinum vegna saurs úr fiskum eða útskolunar úr fóðri. Þess vegna er einn möguleikinn sá að mæla styrk efnisins í vatninu við lok upptökutímabilsins, einkum ef hálfkyrrstöðuuppsetning er notuð, til að hjálpa til við að ákvarða hvort vatnstengd váhrif hafi orðið.

Greina skal sýni m.t.t. prófunarefnisins með fastsettri og fullgiltri aðferð. Forrannsóknarvinna skal fara fram til að ákvarða magngreiningarmörk, hlutfall endurheimtar, truflanir og greiningarbreytileika í fyrirhuguðum sýnaefnivið. Ef verið er að prófa geislamerkt efni skal taka sömu atriði með í reikninginn og í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum þegar greining á fóðri kemur í stað greiningar á vatni (sjá 65. lið).

Greining á fiskum

Í hverri sýnatöku úr fiski skal taka 5–10 fiska úr váhrifa- og samanburðarmeðhöndlun (í sumum tilvikum er hægt að fækka fjölda samanburðarfiska; sjá 134. lið).

Hver sýnataka skal fara fram á sama tíma á hverjum tilraunadegi (miðað við fóðrunartíma) og skal tímasett þannig að líkurnar á að fóður sé eftir í þörmunum meðan á upptökufasanum stendur og í fyrsta hluta hreinsunarfasans séu lágmarkaðar til að koma í veg fyrir falskt framlag til heildarstyrkleika prófunarefnisins (þ.e. fjarlægja skal fisk, sem sýni er tekið úr, í lok tilraunadags og hafa í huga að tilraunadagur hefst við fóðrun og lýkur við næstu fóðrun, u.þ.b. 24 klst. síðar. Hreinsun hefst við fyrstu fóðrun með óíbættu fóðri; sjá 128. lið). Fyrsta sýni úr hreinsunarfasa (tekið skömmu áður en önnur fóðrun með óíbættu fóðri fer fram) er mikilvægt því framreikningur til baka um einn dag, miðað við þessa mælingu, er notaður til að meta styrk á tímapunkti núll ($C_{0,d}$, styrkur í fiskunum við lok upptöku/upphaf hreinsunar). Valkvætt er að fjarlægja meltingarveginn úr fiskunum og greina hann sérstaklega við lok upptöku og á 1. og 3. degi hreinsunar.

Við hverja sýnatöku skal taka fiska úr báðum prófunarkerjum og meðhöndla þá á sama hátt og lýst er í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum (sjá 61.–63. lið).

Styrkur prófunarefnis í heilum fiski (blautvigt) er mældur a.m.k. við lok upptökufasans og meðan hreinsunarfasinn stendur yfir, bæði í samanburðar- og prófunarhópum. Mælt er með fjórum til sex sýnatökupunktum meðan hreinsunarfasinn stendur yfir (t.d. 1., 3., 7., 14. og 28. dagur). Valkvætt er að fella inn sýnatökupunkt til viðbótar eftir upptöku í 1–3 daga til að meta aðlífunargetu út frá línulegum fasa upptökunnar í fiskunum á sama tíma og váhrifatímabilið er nýlega hafið. Tvö meiri háttar frávik frá áætluninni eru til: i. ef notaður er framlengdur upptökufasi til að rannsaka hraðafræði upptöku verða til fleiri sýnatökupunktar meðan á upptökufasanum stendur og þess vegna þarf að bæta við fiskum (sjá 126. lið); ii. ef rannsóknin hefur verið stöðvuð við lok upptökufasans vegna þess að upptaka var ekki mælanleg (sjá 131. lið). Vega skal einstaka fiska sem sýni er tekið úr (og mæla heildarlengd þeirra) til að hægt sé að ákvarða vaxtarhraðafasta. Einnig er hægt að mæla styrk efnisins í sérstökum fiskvefjum (ætum og óætum hlutum) við lok upptöku og á völdum hreinsunartímum. Ef verið er að prófa geislamerkt efni skal taka sömu atriði með í reikninginn og varðandi aðferðina með vatnstengdum váhrifum þegar greining á fóðri kemur í stað greiningar á vatni (sjá 65. lið).

Að því er varðar reglubundna notkun á viðmiðunarefni (sjá 25. lið) er ákjósanlegast að styrkur sé mældur í prófunarhópnum við lok upptöku og á öllum hreinsunartímum sem eru tilgreindir fyrir prófunarefnið (heill fiskur); einungis þarf að mæla styrk í samanburðarhóp við lok upptöku (heill fiskur). Hægt er að nota aðra aðferð við tilteknar aðstæður, eftir því sem hér segir, (t.d. ef greiningartækni fyrir prófunarefni og viðmiðunarefni er ósamrýmanleg þannig að bæta þyrfti við fiskum til að fylgja sýnatökuáætluninni) til að lágmarka fjölda fiska sem þarf að bæta við. Styrkur viðmiðunarefnisins er einungis mældur á degi 1 og 3 í hreinsun og hægt er að velja tvo sýnatökupunkta í viðbót sem eru valdir þannig að hægt sé að gera áreiðanlegt mat á styrk á tímapunkti núll ($C_{0,d}$) og k_2 að því er varðar viðmiðunarefnið.

Ef unnt er skal mæla fituefnainnihald í hverjum fiski fyrir sig í hverri sýnatöku eða a.m.k. við upphaf og lok upptökufasans og við lok hreinsunarfasans. (sjá 56. og 67. lið). Ef til vill er hægt að nota sömu fiska til að ákvarða fituefnainnihald og styrk prófunarefnisins, með hliðsjón af greiningaraðferðinni (sjá 67. lið og 4. viðbæti). Þetta er ákjósanlegt á grundvelli þess að fækka fiskum. Ef þetta er hins vegar ekki mögulegt er hægt að nota sömu aðferð og lýst er í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum (sjá 56. lið að því er varðar valkosti til annars konar mælinga á fituefnum). Í skýrslunni skal gera grein fyrir aðferðinni sem er notuð til að magngreina fituefnainnihaldið.

Gæði greiningaraðferðar

Gera skal athuganir á tilraunum til að tryggja sértæki, nákvæmni, samkvæmni og samanburðarnákvæmni efnasértæku greiningaraðferðarinnar sem og endurheimt prófunarefnisins úr bæði fóðri og fiski.

Mæling á vexti fiska

Við upphaf prófunar þarf að vega sýni af fiskum úr stofnþýði (og mæla heildarlengd þeirra). Taka skal sýni úr þessum fiskum skömmu áður en fyrsta íbætta fóðrið er gefið (t.d. einni klst.) og setja þau á tilraunadag 0. Fjöldi fiska í þessu sýni skal a.m.k. vera sá sami og í sýnunum meðan prófunin stendur yfir. Hægt er að nota að einhverju leyti sömu fiska og eru notaðir til greiningar á fituefnum fyrir upphaf upptökufasans (sjá 153. lið). Við hverja sýnatöku er byrjað á að vigta fiskana og mæla lengd þeirra. Í hverjum einstökum fiski skal tengja vigtaða þyngd og mælda lengd við greindan styrk íðefnis (og fituefnainnihald, ef við á), t.d. með því að nota einkvæmt auðkenni fyrir hvern fisk sem sýni er tekið úr. Hægt er að nota mælingar á þessum fiskum, sem sýni eru tekin úr, til að áætla þyngd (og lengd) fiska sem eftir eru í prófunar- og samanburðarílátum

Mat á tilraun

Gera skal athuganir á dánartíðni og skrá hana daglega. Gera skal viðbótarathuganir á skaðlegum áhrifum, t.d. óeðlilegt atferli eða litarháttur, og skrá þær. Fiskar teljast dauðir ef engar öndunarhreyfingar sjást og engin viðbrögð við vægu líkamlegu áreiti. Fjarlægja skal alla dauða fiska og fiska sem eru greinilega dauðvona.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Prófunarniðurstöður eru notaðar til að leiða út hreinsunarhraðafasta (k_2) sem fall af heildarblautvigt fisks. Vaxtarhraðafasti, k_g, byggður á meðaltalsaukningu á þyngd fiska, er reiknaður út og notaður til að búa til vaxtarleiðréttan hreinsunarhraðafasta, k_{2g}, ef við á. Að auki skal gera grein fyrir aðlífunargetu (α; frásog frá þörmum), fæðutengdum lífmögnunarhraðastuðli (BMF_K) (ef nauðsyn krefur, vaxtarleiðréttum fæðutengdum lífmögnunarhraðastuðli (BMF_{Kg})), fituefnaleiðréttu gildi hans (fituefnaleiðréttur fæðutengdur lífmögnunarhraðastuðull (BMF_{KL}) eða fituefna- og vaxtarleiðréttur fæðutengdur lífmögnunarhraðastuðull (BMF_{KgL}) ef hann er leiðréttur m.t.t. þynningar vegna vaxtar) og fóðrunarhlutfalli. Ef hægt er að meta tíma að stöðugu ástandi í upptökufasanum (t.d. 95% af stöðugu ástandi eða t_{95} = 3,0/k_2) er einnig hægt að láta fylgja mat á lífmögnunarstuðli við stöðugt ástand (BMF_{SS}) (sjá 105. og 106. lið og 5. viðbæti) ef t_{95}-gildið bendir til þess að skilyrði fyrir stöðugu ástandi hafi e.t.v. náðst. Nota skal sömu fituefnaleiðréttingu á þennan lífmögnunarstuðul við stöðugt ástand (BMF_{SS}) og notuð er á hraðafræðilega útleiddan lífmögnunarstuðul (fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_K)) til að fá fram fituefnaleiðrétt gildi lífmögnunarstuðuls við stöðugt ástand (BMF_{SSL}) (athygli er vakin á því að ekki er til nein samþykkt aðferð til að leiðrétta lífmögnunarstuðul við stöðugt ástand m.t.t. þynningar vegna vaxtar). Formúlur og dæmi um útreikninga eru sett fram í 7. viðbæti. Til eru aðferðir sem gera það kleift að meta stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) út frá gögnum sem fást úr fóðurrannsókninni. Fjallað er um þetta í 8. viðbæti.

Gögn um þyngd/lengd fiska

Blautvigt og lengd hvers fisks fyrir sig fyrir öll tímabilin eru sett upp í töflu, aðskilið fyrir prófunar- og samanburðarhópa fyrir alla sýnatökudagana meðan upptökufasinn stendur yfir (stofnþýði þegar upptaka hefst; samanburðar- og prófunarhópur við lok upptöku og, ef hann er hafður með, fyrri fasi (t.d. 1.–3. dagur upptöku) og hreinsunarfasi (t.d. 1., 2., 4., 7., 14. og 28. dagur að því er varðar samanburðar- og prófunarhóp)). Þyngd er ákjósanlegur mælikvarði á vöxt m.t.t. þynningar vegna vaxtar. Sjá aðferðir, sem eru notaðar til að leiðrétta gögn m.t.t. þynningar vegna vaxtar, hér á eftir (162. og 163. liður) og í 5. viðbæti.

Gögn um styrk prófunarefnis í fiskum

Einstaklingsbundnar mælingar á leifum prófunarefnis í fiskum (eða í safnsýnum úr fiski ef ekki er unnt að gera einstaklingsbundnar mælingar á fiskum), gefnar upp sem styrkur í blautvigt (massahlutfall), eru settar upp í töflu fyrir prófunar- og samanburðarfiska fyrir einstaka sýnatökutíma. Ef gerð hefur verið greining á fituefnum í hverjum fiski, sem sýni var tekið úr, er hægt að leiða út einstaklingsbundinn fituefnaleiðréttan styrk, gefinn upp sem fituefnastyrkur (massahlutfall fituefna), og setja upp í töflu.

— Mælingum á leifum prófunarefnis í hverjum fiski fyrir sig (eða í safnsýnum úr fiski ef ekki er unnt að gera einstaklingsbundnar mælingar á fiskum, sjá 66. lið) á hreinsunartímabilinu er umbreytt yfir í náttúrulegan logra og teiknaðar upp á móti tíma (dagur). Ef sjónræn skoðun á línuritinu sýnir greinilega einfara er hægt að nota tölfræðilega marktæka einfaraprófun til að fjarlægja falska gagnapunkta sem og skjalfest rök fyrir því að sleppa þeim.

— Línuleg samsvörun minnstu fervika er reiknuð út fyrir gögn um ln (styrkur) á móti hreinsun (dagur). Gera skal grein fyrir hallatölu og skurðpunkti línunnar sem heildarhreinsunarhraðafasta (k_2) og náttúrulegum logra afleidds styrks á tímapunkti núll ($C_{0,d}$) (sjá nánari upplýsingar í 5. og 7. viðbæti). Ef þetta er ekki hægt sökum þess að styrkleikar falla undir magngreiningarmörk í sýni tvö úr hreinsun er hægt að gera varfærnislegt mat á k_2 (sjá 7. viðbæti).

— Dreifni í hallatölu og skurðpunkti línunnar er reiknuð út með því að nota staðlaðar tölfræðiaðferðir og 90% (eða 95%) öryggisbil um þessar niðurstöður er metið og lagt fram.

— Mældur meðaltalsstyrkur í fiskum á lokadegi upptöku (mældur styrkur á tímapunkti núll $C_{0,m}$) er einnig reiknaður út og borinn saman við gildið $C_{0,d}$ sem er leitt út. Ef gildið sem er leitt út er lægra en mælt gildi getur munurinn bent til þess að ómelt, íbætt fóður sé í þörmunum. Ef gildið sem er leitt út er miklu hærra en mælt gildi getur það verið vísbending um að gildið, sem er leitt út frá línulegu aðhvarfi gagna um hreinsun, sé rangt og það skal metið aftur (sjá 7. viðbæti).

Hreinsunarhraðafasti og lífmögnunarstuðull

Til að reikna lífmögnunarstuðulinn út frá gögnunum skal fyrst fá fram aðlífunargetu (frásog prófunarefnisins í þörmunum, α). Í þessu skyni skal nota jöfnu A7.1 í 7. viðbæti; til þess þurfa afleiddur styrkur í fiskum á tímapunkti núll í hreinsunarfasanum ($C_{0,d}$), (heildar) hreinsunarhraðafasti (k_2), styrkur í fóðrinu ($C_{\text{fóður}}$), fasti hlutfalls inntöku af fóðri (e. *food ingestion rate constant*) (*I*) og lengd upptökutímabilsins (*t*) að vera þekkt. Gera skal grein fyrir hallatölu og skurðpunkti línulegu tengslanna milli ln(styrkur) og hreinsunartíma sem heildarhreinsunarhraðafasta (k_2 = hallatala) og styrkleika á tímapunkti núll ($C_{0,d} = e^{\text{skurðpunktur}}$), eins og hér að ofan. Gildi sem eru leidd út skulu könnuð m.t.t. áreiðanleika í líffræðilegu tilliti (þ.e. aðlífunargeta sem brot er ekki stærri en 1). *(I)* er reiknað út með því að deila í massa fóðurs með massa fisks sem er fóðraður á hverjum degi (ef hann er fóðraður á 2% af líkamsþyngd verður (*I*) 0,02). Þó getur þurft að aðlaga fóðrunarhlutfallið sem er notað í útreikningnum m.t.t. vaxtar fiska (þetta er unnt að gera með því að nota þekktan vaxtarhraðafasta til að áætla þyngd fiska á hverjum tímapunkti meðan á upptökufasanum stendur; sjá 7. viðbæti). Í tilvikum þar sem ekki er hægt að leiða út k_2 og $C_{0,d}$, t.d. vegna þess að styrkleikar féllu undir greiningarmörk í sýni tvö úr hreinsun, er hægt að gera varfærnislegt mat á *k* og „háreiknigildi“ fæðutengds lífmögnunarhraðastuðuls (BMF_K), sjá 7. viðbæti.

Um leið og aðlífunargetan (α) hefur fengist er hægt að reikna út lífmögnunarstuðul með því að margfalda α með fasta fyrir hlutfall inntöku (*I*) og deila í með (heildar)hreinsunarhraðafasta (k_2). Vaxtarleiðréttur lífmögnunarstuðull er reiknaður út á sama hátt en með því að nota vaxtarleiðréttan hreinsunarhraðafasta (k_{2g}; sjá 162. og 163. lið). Hægt er að leiða út annars konar mat á aðlífunargetu ef gerð hefur verið greining á vef úr fiskum sem sýni voru tekin úr í fyrri línulegum fasa upptökufasans; sjá 151. lið og 7. viðbæti. Þetta gildi stendur fyrir óháð mat á aðlífunargetu lífveru sem hefur í eðli sínu ekki orðið fyrir váhrifum (þ.e. fiskarnir eru nálægt upphafi upptökufasans). Aðlífunargetan sem er metin út frá gögnum úr hreinsun er alla jafna notuð til að leiða út lífmögnunarstuðul (BMF).

Fituefnaleiðrétting og leiðrétting m.t.t. þynningar vegna vaxtar

Vöxtur fisks meðan hreinsunarfasinn stendur yfir getur lækkað mældan styrk íðefna í fiskinum sem veldur því að heildarhreinsunarhraðafastinn, k_2, er hærri en hann yrði eftir fjarlægingarferlið (t.d. efnaskipti, losun úrgangsefna úr líkamanum) eitt og sér, (sjá 72. lið). Fituefnainnihald prófunarfiska (sem hefur sterk tengsl við uppsöfnun vatnsfælinna efna í lífverum) og fituefnainnihald fóðurs getur verið mjög breytilegt í raun þannig að nauðsynlegt er að leiðrétta það til að sýna lífmögnunarstuðla á gagnlegan hátt. Leiðrétta skal lífmögnunarstuðul m.t.t. þynningar vegna vaxtar (eins og gert er við lífþéttnihraðastuðulinn í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum) og leiðrétta m.t.t. fituefnainnihalds í fóðrinu miðað við fituefnainnihaldið í fiskinum (stuðull til að leiðrétta fituefnainnihald). Jöfnur og dæmi fyrir þessa útreikninga er að finna í 5. viðbæti og 7. viðbæti, eftir því sem við á.

Til að leiðrétta m.t.t. þynningar vegna vaxtar skal reikna út vaxtarleiðréttan hreinsunarhraðafasta (k_{2g}) (sjá jöfnur í 5. viðbæti). Þessi vaxtarleiðrétti hreinsunarhraðafasti (k_{2g}) er síðan notaður til að reikna út vaxtarleiðréttan lífmögnunarstuðul, eins og í 73. lið. Í sumum tilvikum er þessi aðferð ekki möguleg. Í staðgönguaðferð sem sniðgengur þörfina á leiðréttingu m.t.t. þynningar vegna vaxtar þarf að nota gögn um massa prófunarefnis á hvern fisk (heill fiskur) úr hreinsun fremur en gögn um massa prófunarefnis á hverja einingu fiskmassa (styrkur), eins og venjan er. Þessu má auðveldlega ná fram þar eð prófanir samkvæmt þessari aðferð ættu að tengja skráðan styrk í vef við þyngd einstakra fiska. Einföld aðferð til að gera þetta er tilgreind í 5. viðbæti. Athygli er vakin á því að enn skal meta og gera grein fyrir k_2 þó að þessi staðgönguaðferð sé notuð.

Til að leiðrétta m.t.t. fituefnainnihalds í fóðri og fiski, þegar greining á fituefnum hefur ekki verið gerð á öllum fiskum sem sýni hafa verið tekin úr, er meðaltal fituefnaþátta (massahlutfall) í fiskunum og fóðrinu leitt út ([1]). Fituefnaleiðréttingarstuðullinn (L_c) er síðan reiknaður út með því að deila í meðaltal fituefnaþáttarins í fiskinum með meðaltali fituefnaþáttarins í fóðrinu. Deilt er í lífmögnunarstuðulinn, hvort sem hann er vaxtarleiðréttur eða ekki, eftir því sem við á, með fituefnaleiðréttingarstuðlinum til að reikna út fituefnaleiðréttan lífmögnunarstuðul.

Ef efnafræðileg greining og greining á fituinnihaldi hafa verið gerðar á sama fiski á hverjum sýnatökupunkti er hægt að nota fituefnaleiðrétt gögn um vefi fyrir einstaka fiska til að reikna beint út fituefnaleiðréttan lífmögnunarstuðull (BMF) (sjá 37. heimild). Línurit fituefnaleiðréttra gagna um styrk gefur $C_{0,d}$ á fituefnagrundvelli og k_2. Síðan er hægt að halda stærðfræðilegri greiningu áfram með því að nota sömu formúlur í 7. viðbæti en aðlífunargetan (α) er reiknuð út með því að nota fasta hlutfalls inntöku af fóðri með stöðluðu fituinnihaldi (e. *lipid-normalised food ingestion rate constant*) (I_{fituefni}) og styrk í fóðrinu á fituefnagrundvelli ($C_{\text{fóður-fituefni}}$). Fituefnaleiðréttir þættir eru síðan notaðir á sama hátt til að reikna út lífmögnunarstuðul (BMF) (athygli er vakin á því að einnig skal nota leiðréttingu á vaxtarhraðafasta á fituefnaþáttinn fremur en blautvigt fiska til að reikna út fituefna- og vaxtarleiðréttan fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{KgL}).

Túlkun niðurstaðna

Að jafnaði skal ekki vera marktækur munur á meðaltalsvexti í prófunar- og samanburðarhópum til að útiloka eiturhrif. Bera skal saman vaxtarhraðafasta eða vaxtarferla hópanna tveggja með viðeigandi aðferð ([2]).

Prófunarskýrsla

Eftir að rannsókninni er lokið er tekin saman lokaskýrsla sem inniheldur upplýsingar um *prófunarefni*, *prófunartegundir* og *prófunarskilyrði* eins og tilgreint er í 81. lið (eins og í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum). Að auki er gerð krafa um eftirfarandi upplýsingar:

([1]) Þessi aðferð er sértæk fyrir fóðurrannsóknina og er aðgreind frá þeim verkferlum sem fylgt er í aðferðinni með vatnstengdum váhrifum; þess vegna hefur orðið „leiðréttingˮ, verið notað fremur en „stöðlunˮ til að koma í veg fyrir rugling — sjá einnig neðanmálsgrein í 106. lið.

([2]) Hægt er að gera *t*-próf á vaxtarhraðaföstum til að prófa hvort vöxtur í samanburðar- og prófunarhópum er mismunandi eða *F*-próf ef um er að ræða dreifnigreiningu. Ef þörf krefur er hægt að nota *F*-próf eða próf á sennileikahlutfalli (e. *likelihood ratio test*) til að hjálpa til við að velja heppilegt vaxtarlíkan (greinargerð Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 (32. heimild)).

Prófunarefni:

— Hvers konar upplýsingar um stöðugleika prófunarefnis í tilreiddu fóðri.

Prófunarskilyrði:

— Nafnstyrkur efnis í fóðri, tækni til íbætingar, magn (fituefnis) burðarefnis sem er notað í fóðuríbætingarferlið (ef það er notað), mælingar á styrk prófunarefnis í íbættu fóðri fyrir hverja greiningu (gera skal a.m.k. þrjár greiningar áður en rannsókn hefst og við lok upptöku) og meðalgildi.

— Tegund og gæði olíu eða leysis sem burðarefni, ef það er notað, (hreinleiki, birgir o.s.frv.) sem er notað til íbætingar í fóður.

— Tegund fóðurs sem er notað (hlutagreining ([1]), hreinleiki eða gæði, birgir o.s.frv.), fóðrunarhlutfall meðan upptökufasi stendur yfir, magn fóðurs sem gefið er og tíðni (þ.m.t. allar breytingar sem byggjast á þyngd fiska sem sýni eru tekin úr).

— Hvenær fiskum var safnað og þeir aflífaðir til efnagreiningar á hverjum sýnatökupunkti (t.d. einni klukkustund fyrir fóðrun næsta dags).

Niðurstöður:

— Niðurstöður úr hvers kyns forrannsóknarvinnu.

— Upplýsingar um öll skaðleg áhrif sem verður vart.

— Ítarleg lýsing á öllum efnagreiningaraðferðum sem eru notaðar, þ.m.t. greiningarmörk og magnákvörðun, breytileiki og endurheimt.

— Mældur styrkur fituefna í fóðrinu (íbætt fóður og óíbætt fóður), einstök gildi, meðalgildi og staðalfrávik.

— Gögn um þyngd fiska (og lengd), sett upp í töflu, tengd við hvern fisk fyrir sig, bæði fyrir samanburðar- og váhrifahópa (t.d. með því að nota einkvæmt auðkenni fyrir hvern fisk) og útreikningar, afleiddur vaxtarhraðafasti eða -fastar og 95% öryggisbil.

— Gögn um styrk prófunarefnis í fiskum, sett upp í töflu, meðaltal mælds styrks við lok upptöku ($C_{0,m}$), og afleiddur (heildar) hreinsunarhraðafasti (k_2) og styrkur í fiskum við upphaf hreinsunarfasa ($C_{0,d}$) ásamt breytileika í þessum gildum (hallatala og skurðpunktur).

— Gögn um fituefnainnihald í fiskum, sett upp í töflu (skráð á móti sértækum styrk efnis ef við á), meðalgildi fyrir prófunar- og samanburðarhóp við upphaf prófunar, lok upptöku og lok hreinsunar.

— Ferlar (þ.m.t. öll mæld gögn) sem sýna eftirfarandi (ef við á má gefa styrk upp í hlutfalli við allan skrokk dýrsins eða tiltekna vefi úr því):

  — vöxt (þ.e. þyngd fiska (og lengd) á móti tíma) eða náttúrulegan logra umbreyttrar þyngdar sem fall á móti tíma,

  — hreinsun prófunarefnis í fiskunum og

  — náttúrulegan logra umbreytts styrks (ln-styrkur) á móti hreinsunartíma (þ.m.t. afleiddur hreinsunarhraðafasti, k_2, og náttúrulegur logri afleidds styrks í fiskunum við upphaf hreinsunarfasans, $C_{0,d}$).

— Ef sjónræn skoðun á línuriti sýnir greinilega einfara er hægt að nota tölfræðilega marktæka einfaraprófun til að fjarlægja falska gagnapunkta sem og sem skjalfest rök fyrir því að sleppa þeim.

([1]) Tækni til greiningar á fóðri m.t.t. prótín-, fituefna-, hrátrefja- og öskuinnihalds; þessa upplýsingar eru alla jafna fáanlegar hjá fóðurbirginum.

— Útreiknaður, vaxtarleiðréttur hreinsunarhraðafasti og vaxtarleiðréttur helmingunartími.

— Útreiknuð aðlífunargeta (α).

— „Hrár“ fæðutengdur lífmögnunarstuðull (fæðutengdur BMF) og lífmögnunarhraðastuðull, leiðréttur m.t.t. fituefna og þynningar vegna vaxtar („hrár“ og fituefnaleiðréttur, byggt á blautvigt heilla fiska), vefjasértækur lífmögnunarstuðull ef við á.

— Allar upplýsingar sem varða geislamerkt umbrotsefni prófunarefnis og uppsöfnun þeirra.

— Hvaðeina sem telst óvenjulegt í prófuninni, öll frávik frá þessum aðferðum og allar aðrar upplýsingar sem skipta máli.

— Yfirlitstafla um viðeigandi mæld og útreiknuð gögn sem hér segir:

Hreinsunarhraðafastar fyrir efnið og lífmögnunarstuðlar (BMF_K)	
k_g (vaxtarhraðafasti, $dagur^{-1}$):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
k_2 (heildarhreinsunarhraðafasti, $dagur^{-1}$):	Bætið við gildi (95% CI)
k_{2g} (vaxtarleiðréttur hreinsunarhraðafasti, $dagur^{-1}$):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
$C_{0,m}$ (mældur styrkur á tímapunkti núll, styrkur í fiskum við lok upptöku) (µg/g):	Bætið við gildi ± SD ([2])
$C_{0,d}$ (útleiddur styrkur á tímapunkti núll í hreinsunarfasa; µg/g):	Bætið við gildi ± SD ([2])
I (fastsett hlutfall fyrir fóðurinntöku; g fóður/g fisk/á dag):	Bætið við gildi
I_g (skilvirkt fóðrunarhlutfall, leiðrétt fyrir vöxt; g fóður/g fiskur/á dag) ([2]):	Bætið við gildi ± SD ([2])
$C_{fóður}$ (styrkur íðefnis í fóðrinu; µg/g):	Bætið við gildi ± SD ([2])
α (aðlífunargeta efnis):	Bætið við gildi ± SD ([2])
BMF_K (fæðutengdur lífmögnunarhraðastuðull):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
BMF_{Kg} (vaxtarleiðréttur fæðutengdur lífmögnunarhraðastuðull):	Bætið við gildi (95% CI) ([1])
$t_{1/2g}$ (vaxtarleiðréttur helmingunartími í dögum):	Bætið við gildi ± SD ([2])
Lc (fituefnaleiðréttingarstuðull):	Bætið við gildi
BMF_{KgL} (fituefna- og vaxtarleiðréttur fæðutengdur lífmögnunarhraðastuðull):	Bætið við gildi
$BMF_{SS\text{-}L}$ (leiðbeinandi fituefnaleiðréttur lífmögnunarstuðull fyrir stöðugt ástand) ([2]):	Bætið við gildi ± SD ([2])

([1]) CI: öryggisbil (þegar unnt er að meta það).
([2]) SD: Staðalfrávik (þegar unnt er að meta það).

HEIMILDIR:

1) Kafli C.13 í þessum viðauka, Lífþéttni: gegnumstreymisprófun á fiskum.

2) Kafli A.6 í þessum viðauka, Vatnsleysni

3) (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

4) Kafli A.8 í þessum viðauka, Deilistuðull (n-oktanól/vatn): Hristiflöskuaðferð.

5) Kafli A.24 í þessum viðauka, Deilistuðull (n-oktanól/vatn): Aðferð með háþrýstivökvaskiljun.

6) Kafli A.23 í þessum viðauka, Deilistuðull (1-oktanóls og vatns): Hæghrærsluaðferð.

7) Kafli C.7 í þessum viðauka, Vatnsrof sem fall af sýrustigi.

8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

9) Kafli A.5 í þessum viðauka, Yfirborðsspenna vatnslausna

10) Kafli A.4 í þessum viðauka, Gufuþrýstingur.

11) Kafli C.4 í þessum viðauka, Auðlífbrjótanleiki.

12) Kafli C.29 í þessum viðauka, Auðlífbrjótanleiki — koltvísýringur í lokuðum ílátum

13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

22) Kafli C.47 í þessum viðauka, Eiturhrifaprófun á fiskum á fyrri stigum lífs

23) Kafli C.15 í þessum viðauka, Fiskur, prófun á skammvinnum eiturhrifum á fósturvísis- og kviðpokastigi

24) Kafli C.14 í þessum viðauka, Vaxtarprófun á ungfiski.

25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.'

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR OG EININGAR:

Aðlífunargeta (α) er mælikvarði á hlutfallslegt magn efnis sem frásogast frá þörmum inn í lífveruna (α er án mælieiningar en er oft gefið upp sem hundraðshluti fremur en brot).

Uppsöfnun í lífverum er almennt lýst sem ferli þar sem styrkur efnis í lífveru nær gildi sem fer yfir gildið í öndunarmiðlinum (t.d. vatni hjá fiskum eða lofti hjá spendýrum), fóðrinu eða hvort tveggja (1. heimild).

Lífþéttni er aukning á styrk prófunarefnis í eða á lífveru (eða tilteknum vefjum hennar), miðað við styrk prófunarefnisins í umhverfi hennar.

Lífþéttnistuðull (BCF eða K_B) er styrkur prófunarefnisins, allan tímann meðan á upptökufasa þessarar uppsöfnunarprófunar stendur, í eða á fiskinum eða tilteknum vefjum hans (C_f sem mg/kg), deilt með styrk efnisins í umhverfi hans (C_w sem mg/l). Lífþéttnistuðull (BCF) er gefinn upp í $l \cdot kg^{-1}$. Vinsamlegast veitið því athygli að ekki er gerð grein fyrir leiðréttingum vegna vaxtar og/eða staðlaðs fituefnainnihalds.

Lífmögnun er aukning á styrk prófunarefnis í eða á lífveru (eða tilteknum vefjum hennar), miðað við styrk prófunarefnisins í fóðrinu.

Lífmögnunarstuðull (BMF) er styrkur efnis í rándýri miðað við styrkinn í bráð (eða fóðri) rándýrsins við stöðugt ástand. Í aðferðinni sem lýst er í þessari prófunaraðferð er þess vandlega gætt að forðast váhrif með vatnsfasa og þess vegna er ekki hægt að gera beinan samanburð á gildi lífmögnunarstuðuls (BMF) úr þessari prófunaraðferð og gildi lífmögnunarstuðuls (BMF) úr vettvangsrannsókn (þar sem hægt er að sameina váhrif í vatni og fæðutengd váhrif).

Fæðutengdur lífmögnunarstuðull (fæðutengdur BMF) er hugtakið sem er notað í þessari prófunaraðferð til að lýsa niðurstöðum úr prófun á fæðutengdum váhrifum en þar er þess vandlega gætt að forðast váhrif með vatnsfasa og þess vegna er ekki hægt að gera beinan samanburð á gildi fæðutengds lífmögnunarstuðuls (BMF) úr þessari prófunaraðferð og gildi lífmögnunarstuðuls (BMF) úr vettvangsrannsókn (þar sem hægt er að sameina váhrif í vatni og fæðutengd váhrif).

Hreinsunarfasi eða fasi eftir váhrif (tap) er tíminn eftir að prófunarfiskurinn hefur verið fluttur úr miðli með prófunarefninu í miðil sem er laus við það efni, þegar hreinsun (eða hreint tap) efnisins úr prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) er rannsakað.

Fasti fyrir hreinsunar(tap)hraða (k_2) er tölugildi sem skilgreinir hraða lækkunar á styrk prófunarefnisins í prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) eftir að prófunarfiskurinn hefur verið fluttur úr miðli sem inniheldur prófunarefnið yfir í miðil sem er laus við það efni (k_2 er gefinn upp sem $dagur^{-1}$).

Uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) er mælikvarði á styrk kolefnis sem á upptök sín í uppleystum lífrænum uppsprettum í prófunarmiðlinum.

Váhrifa- eða upptökufasi er sá tími sem fiskurinn verður fyrir váhrifum af prófunarefninu.

Fóðurinntökuhlutfall (I) er meðaltalsmagn fóðurs sem hver fiskur étur á hverjum degi miðað við áætlaða heildarlíkamsþyngd meðalfisks (gefið upp sem g fóður/g fiskur/á dag).

Lífþéttnihraðastuðull (BCF_K) er hlutfallið milli upptökuhraðafastans, k_1, og hreinsunarhraðafastans k_2 (*þ.e.* k_1/k_2 — sjá samsvarandi skilgreiningar í þessum viðbæti). Að jafnaði skal gildið vera sambærilegt við lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) (sjá skilgreiningu hér að framan) en frávik geta orðið ef stöðugt ástand var ótryggt eða ef leiðréttingar fyrir vöxt hafa verið notaðar á lífþéttnihraðastuðulinn.

Staðlaður lífþéttnihraðastuðull fituefna (BCF_{KL}) er staðlaður samkvæmt fiski með 5% fituefnainnihald.

Staðlaður, vaxtarleiðréttur lífþéttnihraðastuðull fituefna (BCF_{KgL}) er staðlaður samkvæmt fiski með 5% fituefnainnihald og leiðréttur m.t.t. vaxtar á rannsóknartímabilinu eins og lýst er í 5. viðbæti.

Staðlaður lífþéttnistuðull fituefna við stöðugt ástand (BCF_{SSL}) er staðlaður samkvæmt fiski með 5% fituefnainnihald.

Fjölþáttaefni er skilgreint að því er varðar efnareglugerðina (REACH) sem efni þar sem fleiri en einn aðalefnisþáttur er fyrir hendi í styrk sem nemur á bilinu 10–80% (massahlutfall).

Deilistuðull fyrir oktanól-vatn (K_{OW}) er hlutfallið milli leysni efnis í n-oktanóli og vatni við jafnvægi (aðferð A.8), (aðferðir A.8 (2. heimild), A.24 (3. heimild), A.23 (4. heimild)); einnig gefinn upp sem P_{OW}. Logri K_{OW} er notaður sem vísbending um þá lífþéttni sem efni getur náð í lagarlífverum.

Agnir úr lífrænu kolefni (POC) er mælikvarði á styrk kolefnis sem á upptök sín í lífrænum svifefnum í prófunarmiðlinum.

Örútdráttur í fastfasa (SPME) er greiningartækni án leysis, þróuð fyrir þynningarkerfi. Í þessari aðferð eru fjölliðuhúðaðar trefjar látnar verða fyrir váhrifum af loft- eða vökvafasa sem inniheldur greiniefnið sem er til mælingar. Alla jafna er notaður lágmarksgreiningartími þannig að skapaðar séu jafnvægisaðstæður milli fastra og fljótandi fasa, að því er varðar tegundirnar sem eru mældar. Síðan er hægt að ákvarða styrk greiniefnisins sem er til mælingar beint út frá trefjunum eða eftir að það hefur verið dregið út úr trefjunum í leysi, með hliðsjón af tækninni til ákvörðunar.

Stöðugt ástand sést í línuriti fyrir prófunarefni í fiski (C_f) á móti tíma þegar ferillinn verður samsíða tímaásnum og þrjár mælingar í röð á C_f í sýnum, sem eru tekin með að minnsta kosti tveggja daga millibili, gefa niðurstöður þar sem munur milli mælinga er innan við ± 20% og engin marktæk aukning á C_f á tímabilinu frá fyrstu til síðustu greiningar í röð. Þegar safnsýni eru greind þurfa hið minnsta fjórar greiningar að fara fram í röð. Ef upptaka prófunarefna er hæg er æskilegra að sjö dagar líði milli þess að sýni séu tekin.

Lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) tekur ekki umtalsverðum breytingum á löngu tímabili þar eð styrkur prófunarefnisins í umhverfinu helst stöðugur á tímabilinu (sjá skilgreiningu á stöðugu ástandi).

Heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) er mælikvarði á styrk kolefnis sem á upptök sín í öllum lífrænum uppsprettum í prófunarmiðlinum, þ.m.t. uppsprettur agna og uppleystra efna.

Fastinn fyrir upptökuhraða (k_1) er tölugildi sem skilgreinir hraða hækkunar á styrk prófunaríðefnis í/á prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) þegar fiskurinn er látinn verða fyrir váhrifum af efninu (k_1 er gefinn upp sem $l\ kg^{-1}\ dagur^{-1}$).

Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni og líffræðileg efni eru þekkt sem UVCB-efni.

Íðefni er efni eða blanda.

Prófunaríðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

HEIMILDIR:

1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

2) Kafli A.8 í þessum viðauka, Deilistuðull (n-oktanól/vatn): Hristiflöskuaðferð.

3) Kafli A.24 í þessum viðauka, Deilistuðull (n-oktanól/vatn): Aðferð með háþrýstivökvaskiljun.

4) Kafli A.23 í þessum viðauka, Deilistuðull (1-oktanóls og vatns): Hæghrærsluaðferð.

———

2. viðbætir

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efnisþáttur	Styrkmörk
Efnisagnir	5 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	2 mg/l
Ójónað ammoníak	1 µg/l
Klórleifar	10 µg/l
Heildarmagn fosfórlífrænna varnarefna	50 ng/l
Heildarmagn klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	50 ng/l
Heildarmagn lífræns klórs	25 ng/l
Ál	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kóbalt	1 µg/l
Kopar	1 µg/l
Járn	1 µg/l
Blý	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Sink	1 µg/l
Kadmíum	100 ng/l
Kvikasilfur	100 ng/l
Silfur	100 ng/l

3. viðbætir

FISKTEGUNDIR SEM ERU RÁÐLAGÐAR TIL PRÓFUNAR

Ráðlagðar tegundir	Ráðlagt svið prófunarhitastigs (°C)	Ráðlögð heildarlengd prófunardýrs (cm) ([2])
Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebradanni	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Breiðkollur	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Vatnakarpi	20–25	8,0 ± 4,0 ([3])
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck og Schlegel) Rískarpi	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gúbbi	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Röðulborri	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Regnbogasilungur	13–17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Hornsíli	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer *et al.* (1. heimild)

([2]) Tekið skal fram að í prófuninni sjálfri er ákjósanlegast að nota þyngd sem mælikvarða á frávik frá stærðar- og vaxtarhraðaföstum. Þó er viðurkennt að lengd er hagkvæmari ráðstöfun ef velja þarf fiskana sjónrænt í upphafi tilraunar (þ.e. úr stofnþýði).

([3]) Þetta lengdarsvið er tilgreint í „Testing Methods for New Chemical Substances“ o.s.frv., byggt á lögum í Japan um eftirlit með íðefnum (e. *Chemical Substances Control Law* (CSCL)).

Ýmsar tegundir árósa- og sjávarfiska hafa minna verið notaðar, t.d.:

Blettabaulari	(*Leiostomus xanthurus*)
Kjammkerplingur	(*Cyprinodon variegatus*)
Gljáæringi	(*Menidia beryllina*)
Skinkarpi	(*Cymatogaster aggregata*)
Sólflúra	(*Parophrys vetulus*)
Kvíslbroddi	(*Leptocottus armatus*)
Hornsíli	(*Gasterosteus aculeatus*)
Vartari, barri	(*Dicentracus labrax*)
Hreisturglæsir	(*Alburnus alburnus*)

Ferskvatnsfiskarnir, sem eru taldir upp í töflunni hér að ofan, eru auðveldir í eldi og/eða fáanlegir víða allt árið um kring en sjávar- og árósategundirnar fást að hluta eingöngu í tilteknum löndum. Unnt er að fjölga þeim og rækta, annaðhvort í fiskeldisstöðvum eða á rannsóknarstofunni, við stýrð skilyrði að því er varðar sjúkdóma og sníkjudýr svo að prófunarfiskurinn verður heilbrigður og uppruni hans þekktur. Þessir fiskar fást víða um heim.

HEIMILDIR:

1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

———

4. viðbætir

SÝNATÖKUÁÆTLANIR FYRIR PRÓFANIR Á VATNS- OG FÆÐUTENGDUM VÁHRIFUM

1. **Fræðilegt dæmi um sýnatökuáætlun fyrir heildarprófun á lífþéttni við vatnstengd váhrif með log K_{OW} = 4.**

Sýnataka úr fiski	Tímaáætlun sýnatöku		Fjöldi vatnssýna (1)	Fjöldi fiska í hverju sýni (1)
	Nauðsynleg lágmarkstíðni (dagar) (2)	Viðbótarsýnataka (dagar) (2)		
Upptökufasi				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4–8 (5)
				(3 (6))
Hreinsunarfasi				Fiskur fluttur í vatn sem er laust við prófunarefni
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Sýnataka úr fiski	Tímaáætlun sýnatöku		Fjöldi vatnssýna ([1])	Fjöldi fiska í hverju sýni ([1])
	Nauðsynleg lágmarkstíðni (dagar) ([2])	Viðbótarsýnataka (dagar) ([2])		
Upptökufasi				
10	14,0		2	4–8 ([5])
		17,5		(4+3 ([6]))
SAMTALS				40–72 (48–80) ([5])

([1]) Tölur í svigunum eru fjöldi sýna (af vatni eða fiski) sem taka skal ef viðbótarsýni eru tekin.
([2]) Fyrir prófunina er k_2 fyrir log K_{OW} 4,0 áætlað 0,652 dagar^{-1}. Heildarlengd tilraunarinnar er sett á 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dagar, þ.e. 14 dagar. Upplýsingar um matið á t_{SS} er að finna í 5 viðbæti.
([3]) Takið sýni af vatninu þegar að lágmarki 3 „ker-rúmmál“ hafa streymt í gegn.
([4]) Þessir fiskar eru teknir úr stofnþýðinu.
([5]) Ef þörf er á meiri nákvæmni eða rannsóknum á efnaskiptum sem útheimta fleiri fiska skal taka sýni úr þeim sérstaklega við lok upptöku- og hreinsunarfasanna (sjá 40. lið).
([6]) Það kann að reynast þörf fyrir a.m.k. 3 fiska til viðbótar til greiningar á fituefnainnihaldi ef ekki er mögulegt að nota sömu fiska og sýni eru tekin úr m.t.t. styrkleika efnis við upphaf prófunarinnar, lok upptökufasans og lok hreinsunarfasans. Vinsamlegast veitið því athygli að í mörgum tilvikum ætti að vera mögulegt að nota einungis samanburðarfiskana 3 (sjá 56. lið).

2. **Fræðilegt dæmi um sýnatökuáætlun fyrir fæðutengda uppsöfnun efnis í lífverum eftir 10 daga upptökufasa og 42 daga hreinsunarfasa.**

Sýnataka	Tímaáætlun sýnatöku		Fjöldi sýna úr fóðri	Fjöldi fiska í hverju sýni	
	Dagur í fasa	Sýni úr fleiri fiskum?		Prófunarhópur	Samanburðarhópur
Upptökufasi					
1	0	Hugsanlegt ([1]) ([2])	3 — prófunarhópur	0	5–10
			3 — samanburðarhópur ([1])		(8–13) ([2])
1A ([3])	1–3			5–10	5–10
2	10	Já ([4])	3 — prófunarhópur	10–15 ([4])	5–10
			3 — samanburðarhópur ([1])	(13–18) ([5])	(8–13) ([5])
Hreinsunarfasi					
3	1	Já ([4])		10–15 ([4])	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10

Sýnataka	Tímaáætlun sýnatöku		Fjöldi sýna úr fóðri	Fjöldi fiska í hverju sýni	
	Dagur í fasa	Sýni úr fleiri fiskum?		Prófunarhópur	Samanburðarhópur
Upptökufasi					
6	7	Já ([4])		10–15 ([4])	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	Já ([4])		10–15 ([4]) (13–18) ([5])	5–10 (8–13) ([5])
SAMTALS				59–120 (63–126) ([4]) ([5])	50–110 (56–116) ([4]) ([5])

([1]) Þrjú sýni úr fóðri frá bæði samanburðar- og prófunarhópum eru greind m.t.t. styrkleika prófunarefnis og fituefnainnihalds.
([2]) Fiskar eru teknir til sýnatöku úr stofnþýði, eins nálægt upphafi rannsóknar og unnt er, taka skal sýni úr a.m.k. 3 fiskum úr stofnþýðinu við upphaf prófunar m.t.t. fituefnainnihalds.
([3]) (Valkvæð) sýnataka snemma í upptökufasanum gefur gögn til að reikna út samlögunargetu prófunarefnisins við fóðrið sem hægt er að bera saman við aðlífunargetuna sem er reiknuð út frá gögnum úr hreinsunarfasa.
([4]) Hægt er að taka sýni úr 5 fiskum til viðbótar m.t.t. vefjasértækrar greiningar.
([5]) Það kann að reynast þörf fyrir a.m.k. 3 fiska til viðbótar til greiningar á fituefnainnihaldi ef ekki er mögulegt að nota sömu fiska og sýni eru tekin úr m.t.t. styrkleika efnis við upphaf prófunarinnar, lok upptökufasans og lok hreinsunarfasans. Vinsamlegast veitið því athygli að í mörgum tilvikum ætti að vera mögulegt að nota einungis samanburðarfiskana 3 (sjá 56. og 153. lið).

Athugasemd um tímasetningar fyrir fasa og sýnatöku: Upptökufasinn hefst þegar íbætt fóður er gefið í fyrsta sinn. Tilraunadagur stendur yfir frá einni fóðrun þar til skömmu fyrir þá næstu, 24 klst. síðar. Fyrsta sýnataka (1 í töflunni) skal fara fram skömmu áður en fóðrað er í fyrsta sinn (t.d. 1. klst.). Sýnataka meðan rannsókn stendur yfir skal helst fara fram skömmu fyrir fóðrun næsta dags (þ.e. um það bil 23 klst. eftir fóðrun á sýnatökudaginn). Upptökufasinn endar skömmu fyrir fyrstu fóðrun með óíbættu fóðri, þegar hreinsunarfasinn hefst (líklegt er að fiskar í prófunarhóp séu ennþá að melta íbætt fóður á næstu 24 klst. eftir síðustu fóðrun með íbættu fóðri). Þetta þýðir að sýni við lok upptökufasans skal tekið skömmu fyrir fyrstu fóðrun með óíbættu fóðri og fyrsta sýni í hreinsunarfasanum skal tekið u.þ.b. 23. klst. eftir fyrstu fóðrun með óíbættu fóðri.

5. viðbætir

ALMENNIR ÚTREIKNINGAR

1. Inngangur
2. Spáð fyrir um lengd upptökufasans
3. Spáð fyrir um lengd hreinsunarfasans
4. Raðbundin aðferð: ákvörðun á hreinsunar(tap)hraðafasta k_2
5. Raðbundin aðferð: ákvörðun á fasta fyrir upptökuhraða K_1 (einungis aðferð með vatnstengdum váhrifum)
6. Aðferð til að reikna út upptöku- og hreinsunar(tap)hraðafasta samtímis (einungis aðferð með vatnstengdum váhrifum)
7. Leiðrétting m.t.t. þynningar vegna vaxtar fyrir lífþéttnihraðastuðul og lífmögnunarstuðul.
8. Stöðlun fituefna skv. 5% fituefnainnihaldi (einungis aðferð með vatnstengdum váhrifum)

1. INNGANGUR

Hægt er að lýsa almennu líkani með uppsöfnun í fiski í vatni með tilliti til upptöku- og eyðingarferla og horfa framhjá upptöku með fæðu. Aðgreinandi jafna (dC_f/dt) sem lýsir hraða breytinga á styrkleika í fiskum ($mg \cdot kg^{-1} \cdot dag^{-1}$) fæst með (1. heimild):

$$\frac{dC_f}{\mathrm{dt}} = k_1 \times C_w - \left(k_2 + k_g + k_m + k_e\right) \times C_f \qquad \text{[Jafna A5.1]}$$

þar sem

k_1 = Hraðafasti af fyrstu gráðu fyrir upptöku í fiskum ($l \cdot kg^{-1} \cdot dag^{-1}$).

k_2 = Hraðafasti af fyrstu gráðu fyrir hreinsun úr fiskum ($dagur^{-1}$).

k_g = Hraðafasti af fyrstu gráðu fyrir vöxt fiska (þynning vegna vaxtar) ($dagur^{-1}$).

k_m = Hraðafasti af fyrstu gráðu fyrir efnaskiptaumbreytingu ($dagur^{-1}$).

k_e = Hraðafasti af fyrstu gráðu fyrir losun saurs úr líkamanum ($dagur^{-1}$).

C_w = Styrkur í vatni ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = Styrkur í fiskum ($mg\ kg^{-1}$ blautvigt).

Að því er varðar efni sem safnast upp í lífverum má ætla að tímavegið meðaltal (TWA) sé sá styrkur váhrifa í vatni sem skiptir mestu máli (C_w) innan leyfilegs sveiflubils (sjá 24. lið). Mælt er með að reikna út tímavegið meðaltal styrks í vatni samkvæmt verklaginu í 6. viðbæti við prófunaraðferð C.20 (2. heimild). Tekið skal fram að ln-vörpun á styrk vatns er heppileg þegar búist er við veldisvísishrörnun milli endurnýjunartímabila, t.d. í tilhögun hálfkyrrstöðuprófunar. Í gegnumstreymiskerfi er e.t.v. ekki þörf á ln-vörpun á styrk váhrifa. Ef tímavegið meðaltal styrkleika í vatni er leitt út skal gera grein fyrir því og nota það í síðari útreikningum.

Í staðlaðri prófun á lífþéttnistuðli í fiski er hægt að lýsa upptöku og hreinsun með tilliti til tveggja ferla hraðafræði af fyrstu gráðu.

$$Upptökuhraði = k_1 \times C_w \quad \text{[Jafna A5.2]}$$

$$Taphraði\ í\ heildina = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad \text{[Jafna A5.3]}$$

Við stöðugt ástand, að því gefnu að vöxtur og efnaskipti séu óveruleg (*þ.e.* ekki er hægt að greina gildin k_g og k_m frá núlli), jafngildir hraði upptöku hraða hreinsunar og með því að sameina jöfnu A5.2 og jöfnu A5.3 fást eftirfarandi tengsl:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Jafna A5.4]}$$

þar sem

$C_{f\text{-}SS}$ = Styrkur í fiskum við stöðugt ástand (mg kg^{-1} blautvigt).

$C_{w\text{-}SS}$ = Styrkur í vatni við stöðugt ástand (mg l^{-1}).

Hlutfallið á milli k_1/k_2 er þekkt sem lífþéttnihraðastuðull (BCF_K) og ætti að vera jafnt og lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}), sem fæst með hlutfallinu milli styrks við stöðugt ástand í fiskum og styrks í vatni, en frávik geta orðið ef stöðugt ástand var ótryggt eða ef leiðréttingar m.t.t. vaxtar hafa verið notaðar á lífþéttnihraðastuðullinn. Þar eð k_1 og k_2 eru stuðlar þarf stöðugt ástand þó ekki að nást til að leiða út lífþéttnihraðastuðul (BCF_K).

Þessi 5. viðbætir inniheldur almenna útreikninga, byggða á þessum jöfnum af fyrstu gráðu, sem eru nauðsynlegir fyrir prófunaraðferðir með uppsöfnun í lífverum við vatns- og fæðutengd váhrif. Þó eiga 5., 6. og 8. hluti einungis við fyrir aðferðina með vatnstengdum váhrifum en eru teknir með hér þar eð um er að ræða almenna tækni. Raðbundin aðferð (4. og 5. hluti) og samtímis aðferð (6. hluti) gera kleift að reikna út upptöku- og hreinsunarfasta sem eru notaðir til að leiða út lífþéttnihraðastuðla. Raðbundin aðferð til að ákvarða k_2 (4. hluti) er mikilvæg fyrir fæðutengdu aðferðina því hún er nauðsynleg til að reikna út bæði aðlífunargetu og lífmögnunarstuðul (BMF). Í 7. viðbæti er að finna útreikninga sem eru sértækir fyrir fæðutengdu aðferðina.

2. SPÁÐ FYRIR UM LENGD UPPTÖKUFASANS

Áður en prófunin er framkvæmd er unnt að áætla k_2, út frá reynslutengslum milli k_2 og deilistuðli oktanóls/vatns (K_{OW}) eða milli k_1 og lífþéttnistuðulsins, og því einnig hundraðshluta þess tíma sem það tekur að ná stöðugu ástandi. Þó skal tekið fram að jöfnurnar í þessum hluta eiga einungis við þegar upptaka og hreinsun fylgja hraðafræði af fyrstu gráðu. Ef ljóst er að þetta á ekki við er ráðlegt að leita ráða hjá líftölfræðingi og/eða lyfjahvarfafræðingi ef æskilegt er að spá fyrir um upptökufasann.

Áætla má k_2 (dagur^{-1}) með nokkrum aðferðum. Til dæmis er hægt að nota fyrst eftirfarandi reynslutengsl ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ (r^2=0,95) [(3); jafna A5.5]

eða

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad \text{[Jafna A5.6]}$$

Þar sem $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (að því er varðar efni með $\log K_{OW} > 3$) (r^2=0,85)[(4); jafna A5.7]

og $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot \log K_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2=0,90)[(5); jafna A5.8]

([1]) Eins og við á um öll reynslutengsl skal sannprófa að prófunarefnið falli innan notkunarsviðs tengslanna.

W = meðalþyngd meðhöndlaðra fiska (grömm blautvigt) við lok upptöku/upphaf hreinsunar ([1])

Sjá 6. heimild að því er varðar önnur tengsl sem við eiga. Það getur verið hagkvæmt að nota flóknari líkön við mat á k_2, t.d. ef líklegt er að marktæk efnaskipti geti orðið (7. og 8. heimild). Eftir því sem líkanið verður flóknara skal þó gæta enn meiri varkárni við túlkun spáa. Til dæmis getur tilvist nítróhópa bent til hraðra efnaskipta en það á ekki alltaf við. Þess vegna skal notandinn vega og meta niðurstöður úr forspáraðferð út frá efnafræðilegri byggingu og öðrum upplýsingum sem máli skipta (t.d. forrannsóknum) við gerð rannsóknaráætlunar.

Reikna má, með því að nota metna gildið fyrir k_2, þann tíma sem líður þar til fengist hefur tiltekinn hundraðshluti af stöðugu ástandi út frá almennu hraðajöfnunni sem lýsir upptöku og hreinsun (hraðafræði af fyrstu gráðu) að því gefnu að vöxtur og efnaskipti séu óveruleg. Ef verulegur vöxtur verður meðan rannsókn stendur yfir verða mötin, sem lýst er hér á eftir, ekki áreiðanleg. Í slíkum tilvikum er betra að nota vaxtarleiðréttan k_{2g} eins og lýst er síðar (sjá 7. hluta þessa viðbætis):

$$\frac{dC_f}{dt} = K_1 C_W - K_2 C_f \qquad \text{[Jafna A5.9]}$$

eða, ef C_w er fasti:

$$C_f = \frac{K_1}{K_2} \cdot C_W (1 - e^{-K_2 t}) \qquad \text{[Jafna A5.10]}$$

Þegar stöðugt ástand nálgast ($t \rightarrow \infty$), má stytta jöfnu A5.10 (sjá 9. og 10. heimild) í:

$$C_f = \frac{K_1}{K_2} \cdot C_W \qquad \text{[Jafna A5.11]}$$

eða

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{K_1}{K_2} = BCF \qquad \text{[Jafna A5.12]}$$

Þá er lífþéttnistuðull (BCF) × C_w nálgun að styrknum í fiskinum við stöðugt ástand ($C_{f\text{-}SS}$). [Athugasemd: hægt er að nota sömu aðferð við að meta lífmögnunarstuðul (BMF) við stöðugt ástand í fæðutengdri prófun. Í því tilviki er lífþéttnistuðli (BCF) skipt út fyrir lífmögnunarstuðul (BMF) og C_w fyrir $C_{fóður}$, styrkleika í fóðrinu, í jöfnunum hér að ofan.]

Umrita má jöfnu A5.10 þannig að hún verði:

$$C_f = C_{f\_SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Jafna A5.13]}$$

eða

$$\frac{C_f}{C_{f\_SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Jafna A5.14]}$$

Með því að nota jöfnu A5.14 má áætla tímann sem líður þar til tilteknum hundraðshluta af stöðugu ástandi er náð ef gildið fyrir k_2 hefur verið áætlað fyrir fram út frá jöfnu A5.5 eða jöfnu A5.6.

Hafa má til hliðsjónar að tölfræðileg kjörlengd upptökufasans til þess að fá tölfræðilega, viðunandi gögn (lífþéttnihraðastuðull (BCF_K)) er sá tími sem líður þar til ferillinn fyrir logrann af styrk prófunarefnisins í fiskinum, sem er teiknaður á móti tímanum (á línulegum ási), hefur náð a.m.k. 50% af stöðugu ástandi (*þ.e.* 0,69/k_2) en er ekki yfir 95% af stöðugu ástandi (*þ.e.* 3,0/k_2) (11. heimild). Ef uppsöfnun fer yfir 95% af stöðugu ástandi verður útreikningur á lífþéttnistuðli fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) mögulegur.

([1]) Hægt er að áætla þyngd fiska við lok upptökufasans út frá fyrri rannsóknargögnum eða þekkingu á líklegri stærðaraukningu prófunartegundarinnar miðað við dæmigerða upphafsþyngd í prófun á dæmigerðu upptökutímabili (t.d. 28 dagar).

Tíminn sem líður þar til 80% af stöðugu ástandi er náð er (jafna A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-K_2 t}$$ [Jafna A5.15]

eða

$$t_{80} = \frac{-\mathrm{In}(0{,}20)}{K_2} = \frac{1{,}6}{K_2}$$ [Jafna A5.16]

Samsvarandi er tíminn sem líður þar til 95% af stöðugu ástandi er náð:

$$t_{95} = \frac{-\mathrm{In}(0{,}05)}{K_2} = \frac{3{,}0}{K_2}$$ [Jafna A5.17]

Til dæmis yrði lengd upptökufasans (þ.e. tíminn til að ná tilteknum hundraðshluta af stöðugu ástandi, t.d. t_{80} eða t_{95}), að því er varðar prófunarefni með log K_{OW} = 4, (með því að nota jöfnu A5.5, jöfnu A5.16 og jöfnu A5.17):

$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$

$k_2 = 0{,}652$ dagur^{-1}

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \text{ dagar} (59 \text{ klukkustundir})$$

eða $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ days$ (110 klukkustundir)

Að öðrum kosti má nota jöfnuna:

$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31$ (*klst.*) [Jafna A5.18]

til að reikna þann tíma sem líður þar til virkt, stöðugt ástand (t_{eSS}) er komið á (12. heimild). Að því er varðar prófunarefni með log K_{OW} = 4 leiðir þetta af sér:

$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121$ *klst.*

3. SPÁÐ FYRIR UM LENGD HREINSUNARFASANS

Út frá almennu jöfnunni sem lýsir upptöku og hreinsun (þar sem gengið er út frá hraðafræði af fyrstu gráðu, sjá jöfnu A5.9 (1. og 13. heimild)) má einnig spá fyrir um þann tíma sem þarf til að minnka líkamsálag niður í tiltekinn hundraðshluta af upphaflega styrknum.

Að því er varðar hreinsunarfasann, C_w (eða $C_{fóður}$ fyrir fæðutengda prófun) er gert ráð fyrir að hann sé núll. Jöfnuna má þá einfalda þannig að hún verði:

$$\frac{dC_f}{dt} = K_2 C_f$$ [Jafna A5.19]

eða

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-K_2 t}$$ [Jafna A5.20]

þar sem $C_{f,0}$ er styrkurinn í upphafi hreinsunartímabilsins.

Á tímapunktinum t_{50} hefur þá náðst 50% hreinsun:

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

eða

$$t_{50} = \frac{-\mathrm{In}(0{,}50)}{K_2} = \frac{0{,}693}{K}$$

Samsvarandi næst 95% hreinsun við:

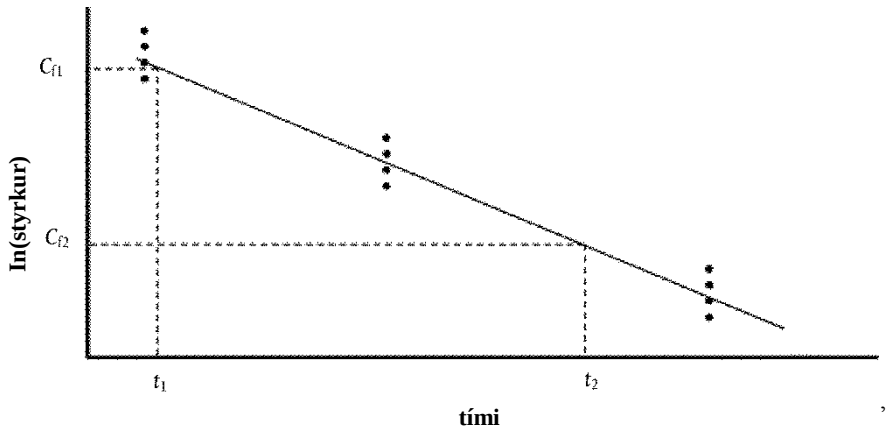
$$t_{95} = \frac{-\mathrm{In}(0{,}50)}{K_2} = \frac{3{,}0}{K_2}$$

Ef miðað er við 80% upptöku á fyrsta tímabilinu ($1{,}6/k_2$) og 95% tap í hreinsunarfasanum ($3{,}0/k_2$), verður hreinsunarfasinn u.þ.b. tvöfalt lengri en upptökufasinn.

Athygli er vakin á því að matið byggist á þeirri forsendu að mynstur upptöku og hreinsunar fylgi hraðafræði af fyrstu gráðu. Ef augljóst er að hraðafræðin er ekki af fyrstu gráðu eru þessi möt ekki gild.

4. RAÐBUNDIN AÐFERÐ: ÁKVÖRÐUN Á FASTA FYRIR HREINSUNAR(TAP)HRAÐA K_2

Gert er ráð fyrir að flestum líf þéttnigögnum hafi verið lýst „tiltölulega“ vel með einföldu tveggja hólfa/tveggja mæliþátta líkani, eins og sést af besta beina ferlinum fyrir styrkleikapunktana í fiskinum (á In-kvarðanum) meðan hreinsunarfasinn stendur yfir.



,

Athygli er vakin á því að frávik frá beinni línu getur verið vísbending um að hreinsunin sé flóknari en svo að hraðafræði hennar sé af fyrstu gráðu. Nota má myndrænu aðferðina til að greina þær tegundir hreinsunar sem víkja frá hraðafræði af fyrstu gráðu.

Til að reikna út k_2 fyrir marga tíma(sýnatöku)punkta skal beita línulegu aðhvarfi á ln(styrkur) á móti tíma. Hallatala aðhvarfslínunnar er mat á hreinsunarhraðafastanum k_2 ([1]). Hægt er að reikna meðalstyrk í fiskunum við upphaf hreinsunarfasans ($C_{0,d}$; sem jafngildir meðalstyrk í fiskunum við lok upptökufasans) auðveldlega út frá skurðpunktinum (þ.m.t. skekkjumörk) ([1]):

$C_{0,d} = e^{skurðpunktur}$ [Jafna A5.21]

([1]) Í flestum forritum sem gera ráð fyrir línulegu aðhvarfi eru einnig gefnar staðalskekkjur og öryggisbil (CI) fyrir mötin, t.d. í *Microsoft Excel* með notkun verkfærapakkans *Data Analysis.*

Til að reikna út k_2 ef einungis tveir tíma(sýnatöku)punktar liggja fyrir (eins og í smækkuðu tilhöguninni) skal setja tvo meðalstyrkleika inn í eftirfarandi jöfnu

$$K_2 = \frac{In(C_{f1}) - In(C_{f2})}{t_2 - t_2} \quad \text{[Jafna A5.22]}$$

þar sem ln(C_{f1}) og ln(C_{f2}) eru náttúrulegir lograr styrksins á tímapunktum t_1 annars vegar og t_2 hins vegar og t_2 og t_1 eru tímapunktarnir þegar sýnin tvö voru tekin miðað við upphaf hreinsunar ([1]).

5. RAÐBUNDIN AÐFERÐ: ÁKVÖRÐUN Á FASTA FYRIR UPPTÖKUHRAÐA K_1 (EINUNGIS AÐFERÐ MEÐ VATNSTENGDUM VÁHRIFUM)

Til að finna gildi fyrir k_1 út frá safni gagna um styrk í tímaröð m.t.t. upptökufasans skal nota tölvuforrit sem samræmist eftirfarandi líkani:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{K_1}{K_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[Jafna A5.23]}$$

þar sem k_2 fæst með fyrri útreikningi, $C_f(t)$ og $C_w(t)$ eru styrkleikar í fiski og vatni, eftir því sem við á, á tímapunkti t.

Til að reikna út k_1 ef einungis tveir tíma(sýnatöku)punktar liggja fyrir (eins og í smækkuðu tilhöguninni) skal nota eftirfarandi jöfnu:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad \text{[Jafna A5.24]}$$

Þar sem k_2 fæst með fyrri útreikningi, er C_f styrkur í fiskum við upphaf hreinsunarfasans og C_w er meðalstyrkur í vatni meðan á upptökufasanum stendur ([2]).

Hægt er að nota sjónræna skoðun á hallatölum k_1 og k_2, þegar þær eru teiknaðar upp á móti mældum gögnum frá sýnatökupunkti, til að meta mátgæði. Ef í ljós kemur að raðbundin aðferð hafi gefið lélegt mat á k_1 skal nota samhliða aðferð til að reikna út k_1 og k_2 (sjá næst 6. hluta). Bera skal hallatölurnar sem verða til aftur saman við uppteiknuð, mæld gögn til að meta mátgæði með sjónrænni skoðun. Ef mátgæðin eru ennþá léleg getur það verið vísbending um að hraðafræði af fyrstu gráðu eigi ekki við og að nota skuli önnur, flóknari líkön.

6. SAMTÍMIS AÐFERÐ TIL AÐ REIKNA ÚT UPPTÖKU- OG HREINSUNAR(TAP)HRAÐAFASTA (EINUNGIS AÐFERÐ MEÐ VATNSTENGDUM VÁHRIFUM)

Hægt er að nota tölvuforrit til að finna gildin fyrir k_1 og k_2 út frá safni gagna um styrk í tímaröð og líkanið:

$$C_f = C_w \cdot \frac{K_1}{K_2} \cdot \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \qquad 0 < t < t_c \quad \text{[Jafna A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{K_1}{K_2} \cdot \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \qquad t > t_c \quad \text{[Jafna A5.26]}$$

þar sem

t_c = tími við lok upptökufasans.

([1]) Öfugt við línulegu aðhvarfsaðferðina mun notkun á þessari formúlu ekki gefa staðalskekkju fyrir k_2.
([2]) Öfugt við línulega aðlögunaraðferð gefur þessi aðferð alla jafna ekki staðalskekkju eða öryggisbil fyrir áætlað k_1.

Með þessari aðferð má meta staðalskekkjur beint fyrir k_1 og k_2. Ef k_1/k_2 er skipt út fyrir lífþéttnistuðul (sjá jöfnu A5.4) í jöfnu A5.25 og jöfnu A5.26 er líka hægt að meta staðalskekkju og 95% öryggisbil fyrir lífþéttnistuðulinn. Þetta er einkum gagnlegt við að bera saman mismunandi möt vegna gagnavörpunar. Hægt er að aðlaga fylgibreytuna (styrkur í fiskum) með eða án ln-vörpunar sem gerir það kleift að áætla lífþéttnistuðulsóvissu sem af þessu leiðir.

Þar eð sterk fylgni er fyrir hendi milli þáttanna tveggja k_1 og k_2 ef þeir eru áætlaðir samtímis getur verið ráðlegt að reikna fyrst út k_2, einungis út frá hreinsunargögnunum (sjá hér að framan); í flestum tilvikum er hægt að meta k_2 út frá hreinsunarferlinum með talsverðri nákvæmni. Síðan er hægt að reikna k_1 út frá upptökugögnunum með ólínulegri aðhvarfsgreiningu ([1]). Ráðlagt er að nota sömu gagnavörpun við raðbundna aðlögun.

Hægt er að nota sjónræna skoðun á hallatölum, sem verða til þegar þær eru teiknaðar upp á móti mældum gögnum frá sýnatökupunkti, til að meta mátgæði. Ef í ljós kemur að þessi aðferð hafi gefið lélegt mat á k_1 er hægt að nota samtímis aðferð til að reikna út k_1 og k_2. Bera skal aðlagaða líkanið aftur saman við uppteiknuð, mæld gögn til að meta mátgæði með sjónrænni skoðun og bera skal saman áætlun á þáttum fyrir k_1, k_2 og lífþéttnistuðul, sem af þessu leiða, og staðalskekkjur þeirra og/eða öryggisbil milli mismunandi mátgerða.

Ef mátgæðin eru léleg getur það verið vísbending um að hraðafræði af fyrstu gráðu eigi ekki við og að nota skuli önnur, flóknari líkön. Ein af algengustu vandkvæðunum eru vöxtur fiska meðan á prófuninni stendur.

7. LEIÐRÉTTING M.T.T. ÞYNNINGAR VEGNA VAXTAR FYRIR LÍFÞÉTTNIHRAÐASTUÐUL OG LÍFMÖGNUNARSTUÐUL

Í þessum hluta er lýst staðalaðferð til leiðréttingar vegna vaxtar fiska meðan prófun stendur yfir (svokölluð þynning vegna vaxtar) sem er einungis gild þegar hraðafræði af fyrstu gráðu á við. Ef vísbendingar eru um að hraðafræði af fyrstu gráðu eigi ekki við er ráðlegt að leita ráða hjá líftölfræðingi til að fá gilda leiðréttingu á þynningu vegna vaxtar eða að nota massatengdu aðferðina sem er lýst hér á eftir.

Í sumum tilvikum er þessi aðferð til að leiðrétta þynningu vegna vaxtar ekki nógu nákvæm og stundum virkar hún ekki (t.d. að því er varðar efni sem hreinsast mjög hægt og eru prófuð á fiskum sem vaxa mjög hratt getur afleiddur hreinsunarhraðafasti, sem er leiðréttur m.t.t. þynningar vegna vaxtar, k_{2g}, verið mjög lítill þannig að skekkjan í hraðaföstunum tveimur, sem eru notaðir til að leiða hann út, verður þýðingarmikil og í sumum tilvikum getur metið gildi k_g orðið stærra en k_2). Í slíkum tilvikum er hægt að nota staðgönguaðferð (þ.e. massaaðferð), sem gengur einnig þegar hraðafræði vaxtar er ekki af fyrstu gráðu, þar eð komist er hjá þörf fyrir leiðréttingu. Þessi aðferð er tilgreind í lok þessa hluta.

Aðferð til að draga vaxtarhraðafastann frá vegna vaxtarleiðréttingar

Í staðalaðferðinni er öllum einstaklingsbundnum gögnum um þyngd og lengd umbreytt yfir í náttúrulega logra og ln(þyngd) eða ln(1/þyngd) teiknuð upp á móti tíma (dagur), aðskilið fyrir meðhöndlunar- og samanburðarhópa. Sama ferli fer fram aðskilið varðandi gögn úr upptöku- og hreinsunarfösum. Að því er varðar leiðréttingu m.t.t. þynningar vegna vaxtar á alla jafna betur við að nota gögn um þyngd úr allri rannsókninni til að leiða út vaxtarhraðafastann (k_g) en tölfræðilega marktækur mismunur milli vaxtarhraðafasta, sem eru leiddir út frá upptöku- og hreinsunarfasanum, getur bent til þess að nota skuli hreinsunarhraðafastann. Hægt er að nota heildarvaxtarhraða úr rannsóknum á vatnstengdum váhrifum á prófunar- og samanburðarhópum til að kanna hvers kyns meðferðartengd áhrif.

([1]) Það skal þó tekið fram að óvissa í metna gildinu fyrir k_2 er ekki notuð á réttan hátt í líkaninu fyrir uppsöfnun í lífverum ef í reynd er litið á hana sem fasta við stillingu k_1 við aðferðina með raðbundinni aðlögun. Sú lífþéttnistuðulsóvissa sem af þessu leiðir verður því mismunandi milli aðferðar með samtímaaðlögun og aðferðar með raðbundinni aðlögun.

Línuleg samsvörun minnstu fervika er reiknuð út fyrir ln(þyngd fiska) á móti degi (og fyrir ln(1/þyngd) á móti degi) fyrir hvern hóp (prófunar- og samanburðarhópar, einstaklingsbundin gögn, ekki sólarhringsmeðaltal) fyrir alla rannsóknina og upptöku- og hreinsunarfasa með því að nota staðlaðar tölfræðiaðferðir. Dreifni í hallatölum línanna er reiknuð út og notuð til að meta tölfræðilega marktækni (p = 0,05) mismunar á hallatölum (vaxtarhraðafastar) með því að nota *t*-próf (eða dreifnigreiningu ef prófaðir eru fleiri en einn styrkleiki). Gögn um þyngd eru alla jafna betri til leiðréttingar vegna vaxtar. Gögn um lengd, meðhöndluð á sama hátt, geta komið að gagni við að bera saman samanburðar- og prófunarhópa m.t.t. meðferðartengdra áhrifa. Ef mismunur í greiningu á gögnum um þyngd er ekki tölfræðilega marktækur má hópa prófunar- og samanburðargögn og reikna út samanlagðan fasta fyrir vaxtarhraða fiska í rannsókninni (k_g) sem heildarhallatölu línulegrar fylgni. Ef tölfræðilega marktækur mismunur kemur í ljós skal gera grein fyrir hverjum vaxtarhraðafasta fyrir hvern hóp fiska og/eða rannsóknarfasa fyrir sig. Síðan skal nota hraðafasta fyrir hvern meðhöndlaðan hóp til leiðréttingar m.t.t. þynningar vegna vaxtar fyrir viðkomandi hóp. Ef tölfræðilegur mismunur milli upptöku- og hreinsunarhraðafasta kom í ljós skal nota hraðafasta sem eru leiddir út frá hreinsunarfasanum.

Hægt er að draga útreiknaðan vaxtarhraðafasta (k_g gefinn upp sem dagur^{-1}) frá heildarhreinsunarhraðafastanum (k_2) til að fá fram hreinsunarhraðafastann, k_{2g}.

$$k_{2g} = k_2 - k_g$$ [Jafna A5.27]

Deilt er í fasta fyrir upptökuhraða með vaxtarleiðréttum hreinsunarhraðafasta til að fá fram vaxtarleiðréttan stuðul fyrir hraða lífþéttni, táknaðan vaxtarleiðréttan fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{Kg}) eða vaxtarleiðréttan fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{Kg}).

$$BCF_{kg} = \frac{K_1}{K_{2g}}$$ [Jafna A5.28]

Vaxtarhraðafasti, sem er leiddur út fyrir fóðurrannsókn, er notaður í jöfnu A7.5 til að reikna út vaxtarleiðréttan fæðutengdan lífmögnunarhraðastuðul (BMF_{Kg}) (sjá 7. viðbæti).

Massatengd aðferð til leiðréttingar vegna vaxtar

Hægt er að nota annan valkost, þar sem komist er hjá því að leiðrétta m.t.t. vaxtar, í stað ofangreindrar aðferðar til að draga vaxtarhraðafasann frá, sem hér segir. Meginreglan er að nota gögn úr hreinsun á grundvelli massa á hvern heilan fisk fremur en á grundvelli styrks.

Styrk í vefjum í hreinsunarfasanum (massi prófunarefnis/eining fiskmassa) er breytt í massa prófunarefnis/fiskur: styrkur í hverjum fiski fyrir sig er paraður saman við þyngd hans í töfluformi (t.d. með því að nota töflureikni í tölvu) og hver styrkur margfaldaður með heildarþyngd fisks fyrir viðkomandi mælingu, þannig að fáist sett með massa prófunarefnis/fiskur fyrir öll sýni úr hreinsunarfasa.

Náttúrulegur logri gagna um massa efnis sem til verður er teiknaður upp í línu á móti tíma fyrir tilraunina (hreinsunarfasi) eins og gert væri að jafnaði.

Að því er varðar aðferðina með vatnstengdum váhrifum er upptökuhraðafastinn leiddur út á hefðbundinn hátt (sjá 4. og 6. hluta); athygli er vakin á því að nota skal „eðlilegt“ k_2-gildi í ferilaðlöguðum jöfnum fyrir k_1 og leiða hreinsunarhraðafastann út frá ofangreindum gögnum. Sökum þess að gildið fyrir hreinsunarhraðafastann, sem af þessu leiðir, er óháð vexti þar eð það var leitt út á grundvelli massa á hvern heilan fisk skal tákna það með k_{2g} en ekki k_2.

8. STÖÐLUN FITUEFNA SAMKVÆMT 5% FITUEFNAINNIHALDI (EINUNGIS AÐFERÐ MEÐ VATNSTENGDUM VÁHRIFUM)

Einnig skal gera grein fyrir niðurstöðum um lífþéttnistuðul (hraða og í stöðugu ástandi) úr prófunum á vatnstengdum váhrifum miðað við staðlað fituefnainnihald í fiski sem nemur 5% blautvigt nema hægt sé að halda því fram að prófunarefnið safnist ekki fyrst og fremst saman í fituefnum (t.d. geta nokkur perflúoruð efni bundist prótínum). Breyta þarf gögnum um styrk í fiski, eða lífþéttnistuðlinum, í 5% fituefnainnihald á grundvelli blautvigtar. Ef sömu fiskar eru notaðir til að mæla styrk efnis og fituefnainnihald á öllum sýnatökupunktum útheimtir það að hver einstök mæling á styrk í fiski sé leiðrétt m.t.t. fituefnainnihalds viðkomandi fisks.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Jafna A5.29]}$$

þar sem

$C_{f,L}$ = staðlaður styrkur fyrir fituefni í fiski (mg kg^{-1} blautvigt)

L = fituefnaþáttur (á grundvelli blautvigtar)

C_f = styrkur prófunarefnis í fiski (mg kg^{-1} blautvigt)

Ef ekki var gerð greining á fituefnum í öllum fiskum sem sýni var tekið úr er notað meðalfituefnagildi til að staðla lífþéttnistuðulinn. Að því er varðar lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand skal nota meðalgildið sem er skráð við lok upptökufasans í meðferðarhópnum. Að því er varðar að staðla lífþéttnihraðastuðul geta verið tilvik þar sem tilefni er til að nota aðra aðferð, t.d. ef fituefnainnihaldið breyttist merkjanlega meðan á upptöku- eða hreinsunarfasanum stóð. Þó skal hvort eð er nota að jafnaði fóðrunarhlutfall sem lágmarkar verulegar breytingar á fituefnainnihaldi.

$$BCF_{KL} = \frac{0.005}{L_n} \cdot BCF_k \qquad \text{[Jafna A5.30]}$$

þar sem

BCF_{KL} = staðlaður lífþéttnihraðastuðull fituefna (L kg^{-1})

L_n = meðaltal fituefnaþáttar (á grundvelli blautvigtar)

lífþéttnihraðastuðull (BCF_K) = lífþéttnihraðastuðull (L kg^{-1})

HEIMILDIR:

1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

2) Kafli C.20 í þessum viðauka, Æxlunarprófun á *Daphnia magna*

3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Aðgengilegt á: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2′,4,4′ tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

———

6. viðbætir

HLUTI MEÐ JÖFNUM FYRIR PRÓFUN Á VATNSTENGDUM VÁHRIFUM: SMÆKKUÐ TILHÖGUN PRÓFUNAR

Rökin fyrir þessari aðferð eru að annað hvort sé hægt að ákvarða lífþéttnistuðul í heildarprófun sem lífþéttnistuðul fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) með því að reikna út hlutfallið milli styrks prófunarefnis í vef fisksins og styrks prófunarefnis í vatninu eða með því að reikna út lífþéttnihraðastuðul (BCF_K) sem hlutfall milli fasta fyrir upptökuhraða k_1 og hreinsunarhraðafasta k_2. Stuðull fyrir hraða lífþéttni (BCF_K) er gildur þó að styrkur efnis við stöðugt ástand náist ekki meðan á upptöku stendur að því tilskildu að upptaka og hreinsun hegði sér að mestu samkvæmt ferlum hraðafræði af fyrstu gráðu.

Ef styrkur efnis í vef (C_{f1}) er mældur þegar váhrifum lýkur (t_1) og styrkur í vef (C_{f2}) er mældur aftur eftir að tími hefur liðið (t_2) er hægt að áætla hreinsunarhraðafastann (k_2) með því að nota jöfnu A5.22 í 5. viðbæti.

Þá er hægt að ákvarða upptökuhraðafastann, k_1, á stærðfræðilegan hátt með því að nota jöfnu A5.23 í 5. viðbæti (þar sem C_f er jafnt og C_{f1} og t er jafnt og t_1) (1. heimild). Lífþéttnihraðastuðull fyrir smækkaða tilhögun (tilgreindur sem lífþéttnihraðastuðull sem er leiddur út frá smækkaðri prófun (BCF_{Km}) til að aðgreina hann frá lífþéttnihraðastuðlum sem eru ákvarðaðir með öðrum aðferðum) er sem hér segir:

$$BCF_{km} = \frac{K_1}{K_2} \qquad \text{[Jafna A6.1]}$$

Styrkleikar eða niðurstöður skulu leiðrétt m.t.t. þynningar vegna vaxtar og staðlaðar við fituefnainnihald í fiski sem nemur 5% eins og lýst er í 5. viðbæti.

Smækkaður lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (smækkaður BCF_{SS}) er lífþéttnistuðull, reiknaður út við lok upptökufasans að því gefnu að stöðugt ástand hafi náðst. Þetta er einungis hægt að áætla þar eð fjöldi sýnatökupunkta er ekki nægur til að sanna þetta.

$$\text{smækkaður BCF}_{ss} = \frac{C_{f-\text{smæSS}}}{C_{w-\text{smæSS}}} \qquad \text{[Jafna A6.2]}$$

þar sem

$C_{\text{f-smæSS}}$ = styrkur í fiskum við ætlað stöðugt ástand við lok upptöku (mg kg^{-1} blautvigt).

$C_{\text{w-smæSS}}$ = styrkur í vatni við ætlað stöðugt ástand við lok upptöku (mg l^{-1}).

HEIMILDIR:

1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

———

7. viðbætir

HLUTI MEÐ JÖFNUM FYRIR PRÓFUN Á FÆÐUTENGDUM VÁHRIFUM

1. Dæmi um magn efnisþátta í hentugu fiskafóðri sem fæst á almennum markaði

2. Dæmi um tækni til íbætingar í fóður

3. Útreikningur á aðlífunargetu og lífmögnunarstuðli

4. Fituefnaleiðrétting

5. Mat á mun milli mælds styrks á tímapunkti núll (C0,m) og útleidds styrks á tímapunkti núll (*C*0,d)

6. Leiðbeiningar varðandi prófunarefni sem hreinsast mjög hratt

1. DÆMI UM MAGN EFNISÞÁTTA Í HENTUGU FISKAFÓÐRI SEM FÆST Á ALMENNUM MARKAÐI

Meginefnisþáttur	Fiskimjöl
Hráprótín	≤ 55,0%
Hráfita	≤ 15,0% ([1])
Hrátrefjar	≥ 2,0%
Raki	≥ 12%
Aska	≥ 8%

([1]) Á sumum svæðum er e.t.v. einungis mögulegt að fá fiskafóður með fituefnastyrk sem er langt undir þessum efri mörkum. Í slíkum tilvikum skal keyra rannsóknir með fóðri sem inniheldur lægri fituefnastyrk, eins og það er afhent, og fóðrunarhlutfallið aðlagað til samræmis við það til að viðhalda heilbrigði fiskanna. Ekki skal auka fituefnin í fóðrinu á tilbúinn hátt með því að bæta í það olíu.

2. DÆMI UM TÆKNI TIL ÍBÆTINGAR Í FÓÐUR

Almenn atriði

Samanburðarfóður skal tilreitt á nákvæmlega sama hátt og íbætt fóður en án prófunarefnisins.

Til að kanna styrk í meðhöndluðu fóðri skal draga út þrjú sýni úr íbætta fóðrinu með heppilegri útdráttaraðferð og mæla styrk prófunarefnisins eða geislavirkni í útdráttunum. Sýna skal fram á mikla endurheimt í efnagreiningu (> 85%) og lítinn breytileika milli sýna (breytileiki styrks í þremur sýnum sem tekin eru við upphaf prófunarinnar má ekki víkja meira en ± 15% frá meðaltalinu).

Meðan á fæðutengdri prófun stendur skal safna þremur fóðursýnum til greiningar á degi 0 og við lok upptökufasans til að ákvarða innihald prófunarefnisins í fóðrinu.

Tilreiðsla fiskafóðurs með fljótandi prófunarefni (óblandað)

Nafnstyrkur í meðhöndlaða fiskafóðrinu í prófuninni er ákvarðaður, t.d. 500 µg prófunarefnis/g af fóðri. Viðeigandi magni (eftir sameindamassa eða sértækri geislavirkni) af óblönduðu prófunarefni er bætt í þekktan massa af fiskafóðri í glerkrukku eða hverfisvalakúlu. Fiskafóðurmassinn skal nægja fyrir allan upptökufasann (að teknu tilliti til þess að auka þarf magnið við hverja fóðrun vegna þess að fiskarnir stækka). Fiskafóðrið/prófunarefnið skal blandað yfir nótt með hægum snúningi (t.d. með því að nota snúningsblandara eða með snúningi ef hverfisvalakúla er notuð). Íbætta fóðrið skal geymt við skilyrði sem viðhalda stöðugleika prófunarefnisins í fóðurblöndunni (t.d. í kæli) þar til það er notað.

Tilreiðsla fiskafóðurs með maísolíu- eða fisklýsisburðarefni

Föst prófunarefni skulu mulin í mortéli í fíngert duft. Hægt er að bæta fljótandi prófunarefnum beint út í maísolíuna eða fisklýsið. Prófunarefnið er leyst upp í þekktu magni af maísolíu eða fisklýsi (t.d. 5–15 ml). Íbætta olían er öll flutt yfir í hverfisvalakúlu af hentugri stærð. Flaskan, sem er notuð til að tilreiða íbættu olíuna, skal skoluð með tveimur litlum deiliskömmtum af olíunni og þeim bætt í kúluna til að tryggt sé að allt uppleyst prófunarefni hafi flust yfir. Til að tryggja fullkomna uppleysingu/dreifingu í olíunni (eða ef notuð eru fleiri en eitt prófunarefni í rannsókninni) er hræripinna bætt við, tappi settur í flöskuna og hrært hratt í blöndunni yfir nótt. Viðeigandi magni fiskafóðurs (yfirleitt í kögglaformi) fyrir prófunina er bætt í kúluna og innihaldi ílátsins blandað í einsleita blöndu með því að snúa glerkúlunni stöðugt í a.m.k. 30 mínútur en helst yfir nótt. Eftir það er íbætta fóðrið geymt eins og við á (t.d. kælt) til að tryggja stöðugleika prófunarefnisins í fóðrinu fram að notkun.

Tilreiðsla fiskafóðurs með lífrænum leysi

Viðeigandi magn af prófunarefni (eftir sameindamassa eða sértækri geislavirkni), sem nægir til að ná markskammti, er leyst upp í heppilegum lífrænum leysi (t.d. af sýklóhexani eða asetoni, 10–40 ml, en í meira magni, ef nauðsyn krefur, sem ræðst af magni fóðurs sem á að bæta í). Deiliskammtur af þessari lausn eða öll lausnin (bætt við í skömmtum) er blönduð með viðeigandi massa af fiskafóðri sem nægir til að fá fram tilskilinn lágmarksskammt í prófuninni. Hægt er að blanda fóðrið/prófunarefnið saman í blöndunarskál úr ryðfríu stáli og nýíbætta fiskafóðrið er geymt í skálinni undir reykhettu í tvo daga (hrært af og til), til að umframleysirinn geti gufað upp, eða blandað saman í hverfisvalakúlu með samfelldum snúningi. Hægt er að blása umframleysinum burtu með loft- eða köfnunarefnisflæði ef nauðsyn krefur. Þess skal gætt að tryggja að prófunarefnið kristallist ekki þegar leysirinn er fjarlægður. Íbætta fóðrið skal geymt við skilyrði (t.d. í kæli) sem viðhalda stöðugleika prófunarefnisins í fóðurblöndunni og gera skal grein fyrir þessum skilyrðum.

3. ÚTREIKNINGUR Á AÐLÍFUNARGETU OG LÍFMÖGNUNARSTUÐLI

Til að reikna út aðlífunargetu skal fyrst meta heildarhreinsunarhraðafastann skv. 4. hluta 5. viðbætis (með því að nota raðbundna aðferð, þ.e. staðlað línulegt aðhvarf) með því að nota meðaltalsstyrk sýna úr hreinsunarfasanum. Fóðrunarhlutfallsfastinn, *I*, og tímalengd upptöku, *t*, eru þekktar breytur í rannsókninni. $C_{\text{fóður}}$, meðaltal af mældum styrk prófunarefnisins í fóðrinu er mæld breyta í rannsókninni. $C_{0,\text{d}}$, styrkur prófunarefnis í fiskunum við lok upptökufasans, er alla jafna leitt út frá skurðpunkti línurits yfir ln(styrkur) *á móti* hreinsun (dagur).

Aðlífunargeta efnis (α), frásog prófunarefnis í þörmunum) er reiknað út sem:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{fóður}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad \text{[Jafna A7.1]}$$

þar sem:

$C_{0,d}$ = afleiddur styrkur í fiskum á tímapunkti núll í hreinsunarfasanum (mg kg^{-1}).

k_2 = heildarhreinsunarhraðafasti (ekki vaxtarleiðréttur) (dagur^{-1}), reiknaður út samkvæmt jöfnunum í 5. viðbæti, 3. hluta.

I = fasti hlutfalls inntöku af fóðri (g fóður g^{-1} fiskur á dag^{-1}),

$C_{\text{fóður}}$ = styrkur í fóðri (mg kg^{-1} fóður).

t = tímalengd fóðrunartímabilsins (dagur).

Þó getur reynst nauðsynlegt að laga fóðrunarhlutfallið, I, sem er notað í útreikningunum, að vexti fiskanna til að gefa nákvæma aðlífunargetu, α. Í prófun þar sem fiskarnir vaxa verulega meðan á upptökufasanum stendur (þar sem engin leiðrétting er gerð á fóðurmagni til að viðhalda fastsettu fóðrunarhlutfalli) verður virkt fóðrunarhlutfall, eftir því sem líður á upptökufasann, minna en fastsett hlutfall sem leiðir til þess að „raunveruleg“ aðlífunargeta verður meiri. (Veita ber því athygli að þetta er ekki mikilvægt fyrir heildarútreikning á lífmögnunarstuðli því I milli jöfnu A7.1 og jöfnu A7.4 jafnast fullkomlega út). Hægt er að leiða út meðalfóðrunarhlutfall, leiðrétt m.t.t. þynningar vegna vaxtar, I_g, á ýmsan hátt en einföld og hárnákvæm leið er að nota þekktan vaxtarhraðafasta (k_g) til að áætla þyngd prófunarfiskanna á tímapunktum meðan á upptökufasanum stendur, *þ.e.*:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \quad \text{[Jafna A7.2]}$$

þar sem

$W_f(t)$ = meðalþyngd fiska á upptökudegi t

$W_{f,0}$ = meðalþyngd fiska við upphaf tilraunar

Á þennan hátt er (a.m.k.) hægt að áætla meðalþyngd fiska á síðasta degi váhrifa ($W_{\text{f,lok upptöku}}$). Þar eð fóðrunarhlutfallið var fastsett á grundvelli $W_{f,0}$ er hægt að reikna út skilvirkt fóðrunarhlutfall fyrir hvern dag upptöku með því að nota þessar tvær þyngdir. Þá er hægt að reikna út vaxtarleiðrétt fóðrunarhlutfall, I_g (g fóður g^{-1} fiskur á dag^{-1}), til notkunar í stað I ef um er að ræða hraðan vöxt meðan á upptökufasanum stendur, sem

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{\text{f,lok upptöku}}} \quad \text{[Jafna A7.3]}$$

Þegar aðlífunargetan er fengin er hægt að reikna út lífmögnunarstuðulinn (BMF) með því að margfalda hann með fóðrunarhlutfallsfastanum I (eða I_g, ef það er notað til að reikna út α) og deila í útkomuna með heildarhreinsunarhraðafastanum k_2:

$$BMF = \frac{I \times W_{\text{f,o}}}{W_{\text{f,lok upptöku}}} \quad \text{[Jafna A7.4]}$$

Einnig skal reikna vaxtarleiðréttan lífmögnunarstuðul út á sama hátt með því að nota vaxtarleiðréttan hreinsunarhraðafasta (eins og hann fæst skv. 7. hluta í 5. viðbæti). Ef I_g var notað til að reikna út α skal einnig nota það hér í stað I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2,g}} \quad \text{[Jafna A7.5]}$$

þar sem:

α = aðlífunargeta (frásog prófunarefnis í þörmunum).

k_2 = heildarhreinsunarhraðafasti (ekki vaxtarleiðréttur) (dagur^{-1}), reiknaður út samkvæmt jöfnunum í 5. viðbæti, 3. hluta,

k_{2g} = vaxtarleiðréttur hreinsunarhraðafasti (dagur^{-1}),

I = fasti hlutfalls inntöku af fóðri (g fóður g^{-1} fiskur á dag^{-1}).

Vaxtarleiðréttur helmingunartími ($t_{1/2}$) er reiknaður út sem hér segir:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2,g}} \qquad \text{[Jafna A7.6]}$$

Einnig er hægt að meta aðlífunargetu efnisins úr fóðrinu ef leifar í vef eru ákvarðaðar meðan línulegur fasi upptökufasans stendur yfir (á bilinu dagur 1 til dagur 3). Í því tilviki er hægt að ákvarða aðlífunargetu efnisins (α) sem hér segir

$$\alpha = \frac{C_{\text{fiskur}}(t)}{I \times C_{\text{fóður}} \times t} \qquad \text{[Jafna A7.7]}$$

þar sem

$C_{\text{fiskur}}(t)$ = styrkur prófunarefnis í fiski á tímapunkti t (mg kg^{-1} blautvigt).

4. FITUEFNALEIÐRÉTTING

Ef fituefnainnihald var mælt í sömu fiskum og efnagreining var gerð á í öllum sýnatökum skal leiðrétta einstaka styrkleika á fituefnagrundvelli og teikna feril In (styrkur, leiðréttur m.t.t. fituefna) á móti hreinsun (dagur) til að fá $C_{0,d}$ og k_2. Síðan er hægt að reikna út aðlífunargetu (jafna A7.1) á fituefnagrundvelli með því að nota $C_{\text{fóður}}$ á fituefnagrundvelli (þ.e. $C_{\text{fóður}}$ er margfaldað með meðaltali fituefnaþáttarins í fóðrinu). Útreikningur eftir það, með því að nota jöfnu A7.4 og jöfnu A7.5, mun gefa fituefnaleiðréttan (og leiðréttan m.t.t. þynningar vegna vaxtar) lífmögnunarstuðull (BMF) beint.

Að öðrum kosti er meðaltal fituefnaþáttarins (massahlutfall) í fiskunum og í fóðrinu leitt út, bæði fyrir meðhöndlunar- og samanburðarhópa (að því er varðar fóður og fiska í samanburðarhóp er þetta alla jafna út frá gögnum sem eru mæld við upphaf váhrifa og lok þeirra; að því er varðar fiska í meðferðarhóp er það alla jafna eingöngu út frá gögnum sem eru mæld við lok váhrifa). Fituefnainnihald í fiskum getur aukist merkjanlega í sumum rannsóknum; í þeim tilvikum er heppilegra að nota meðaltal fituefnainnihalds í fiskum, reiknað út frá mældum gildum við lok váhrifa og lok hreinsunar. Alla jafna skal einungis nota gögn úr meðferðarhóp til að leiða út báða fituefnaþættina.

Stuðull til að leiðrétta fituefnainnihald (L_c) er reiknaður út sem:

$$L_C = \frac{L_{\text{fiskur}}}{L_{\text{fóður}}} \qquad \text{[Jafna A7.8]}$$

þar sem L_{fiskur} og $L_{\text{fóður}}$ eru meðaltal fituefnaþátta, annars vegar í fiski og hins vegar í fóðri.

Stuðull til að leiðrétta fituefnainnihald er notaður til að reikna út fituefnaleiðréttan lífmögnunarstuðul (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C}$$ [Jafna A7.9]

5. MAT Á MUN MILLI MÆLDS STYRKS Á TÍMAPUNKTI NÚLL ($C_{0,M}$) OG ÚTLEIDDS STYRKS Á TÍMAPUNKTI NÚLL ($C_{0,D}$)

Bera skal saman mældan styrk á tímapunkti núll ($C_{0,m}$) og útleiddan styrk á tímapunkti núll ($C_{0,d}$). Ef þeir eru mjög líkir styður það fyrstu gráðu líkanið sem er notað til að leiða út hreinsunarþættina.

Í sumum rannsóknum getur verið umtalsverður munur á útleiddu gildi á tímapunkti núll, $C_{0,d}$, og meðaltali mælds styrks á tímapunkti núll. $C_{0,m}$ (sjá síðasta punktmerkta liðinn í 159. lið í þessari prófunaraðferð). Ef $C_{0,d}$ er miklu lægra en $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), getur munurinn bent til þess að ómelt, íbætt fóður sé í þörmunum. Þetta er hægt að prófa með tilraunum með því að framkvæma sérstaka greiningu á slægðum þörmum ef viðbótarsýni (heill fiskur) voru tekin og geymd við lok upptökufasans. Ef tölfræðilega gild einfaraprófun, sem er framkvæmd m.t.t. línulegs aðhvarfs hreinsunarfasans, bendir til þess að fyrsti sýnatökupunktur hreinsunar sé fyrir mistök of hár getur að öðrum kosti hentað að framkvæma línulegt aðhvarf til að leiða út k_2 en sleppa fyrsta styrkleikapunktinum í hreinsuninni. Í slíkum tilvikum getur verið heppilegt, ef óvissa í línulegu aðhvarfi hefur minnkað mikið og ljóst er að hraðafræði af fyrstu gráðu hefur að mestu verið fylgt, að nota gildin fyrir $C_{0,d}$ og k_2 sem af þessu leiða við útreikning á aðlífunargetu. Þetta skal rökstutt að fullu í skýrslunni. Einnig er mögulegt að hraðafræði, sem er ekki af fyrstu gráðu, hafi verið að verki í hreinsunarfasanum. Ef þetta er líklegt (þ.e. náttúrulegur logri umbreyttra gagna virðist fylgja ferli, samanborið við uppteiknað línulegt aðhvarf með beinni línu) er ólíklegt að útreikningar á k_2 og $C_{0,d}$ séu gildir og leita skal ráða hjá líftölfræðingi.

Ef $C_{0,d}$ er miklu hærra en mælda gildið ($C_{0,d} >> C_{0,m}$) getur það bent til eftirfarandi: að efnið hafi hreinsast mjög hratt (*þ.e.* að sýnatökupunktar hafi nálgast magngreiningarmörk greiningaraðferðarinnar mjög snemma í hreinsunarfasanum, sjá 6. hluta hér á eftir); að vikið hafi verið frá hraðafræði hreinsunar af fyrstu gráðu; að línulegt aðhvarf til að leiða út k_2 og $C_{0,d}$ sé gallað eða þá að á einhverjum sýnatökupunkti hafi komið upp vandamál með mældan styrk í rannsókninni. Í slíkum tilvikum skal athuga uppteiknað línulegt aðhvarf gaumgæfilega m.t.t. vísbendinga um sýni á magngreiningarmörkum eða við þau og m.t.t. einfara og greinilegrar sveigju (sem bendir til hraðafræði af fyrstu gráðu) og merkja þau í skýrslunni. Lýsa skal öllu síðara endurmati á línulegu aðhvarfi til að bæta metin gildi og færa rök fyrir þeim. Ef merkjanlegt frávik frá hraðafræði af fyrstu gráðu kemur í ljós er ólíklegt að útreikningar á k_2 og $C_{0,d}$ séu gildir og leita skal ráða hjá líftölfræðingi.

6. LEIÐBEININGAR VARÐANDI PRÓFUNAREFNI SEM HREINSAST MJÖG HRATT

Eins og fjallað er um í 129. lið prófunaraðferðarinnar geta sum efni hreinsast svo hratt að ekki er hægt að leiða út áreiðanlegan styrk á tímapunkti núll,$C_{0,d}$, og k_2, sökum þess að ekki er lengur hægt að mæla efnið (styrkur sem liggur við magngreiningarmörk) í sýnum sem eru tekin mjög snemma í hreinsunarfasanum (þ.e. frá og með sýni tvö úr hreinsun). Þetta ástand kom í ljós í hringprófun, sem var framkvæmd til stuðnings þessari prófunaraðferð, með bensó[a]pýreni og var skráð í fullgildingarskýrsluna um aðferðina. Í slíkum tilvikum er ekki hægt að framkvæma línulegt aðhvarf á áreiðanlegan hátt og líklegt er að það gefi óeðlilega hátt mat á $C_{0,d}$ sem leiðir til þess að sýnileg aðlífunargeta verður miklu meiri en 1. Það er mögulegt að reikna út varfærnislegt mat á k_2 og „háreiknigildi“ lífmögnunarstuðuls (BMF) í þessum tilvikum.

Með því að nota þessa gagnapunkta hreinsunarfasans þar sem styrkurinn var mældur, til og með fyrsta styrkleika sem greindist ekki (styrkur við magngreiningarmörk), mun línulegt aðhvarf (með því að nota gögn um náttúrulegan logra umbreytts styrks á móti tíma) gefa mat á k_2. Að því er varðar þess konar tilvik er líklegt að einungis tveir gagnapunktar komi við sögu (t.d. sýni á 1. og 2. degi hreinsunar) og þá er hægt að meta k_2 með því að nota jöfnu A5.22 í 5. viðbæti. Hægt er að nota þetta metna gildi k_2 til að áætla aðlífunargetu samkvæmt jöfnu A7.1 með því að skipta gildi $C_{0,d}$ í jöfnunni út fyrir mældan styrk á tímapunkti núll ($C_{0,m}$) í tilvikum þar sem $C_{0,d}$ er greinilega metið miklu hærra en hefði verið hægt að ná í prófuninni. Ef $C_{0,m}$ var ekki mælanlegt skal nota greiningarmörkin í fiskvefjunum. Ef þetta gefur í einhverjum tilvikum gildi þar sem $\alpha > 1$ er gert ráð fyrir að aðlífunargetan, sem „verstu aðstæður“, sé 1.

Síðan er hægt að meta hæsta fæðutengda lífmögnunarhraðastuðulinn (BMF_K) með því að nota jöfnu A7.4 og hann skal gefa upp sem gildið „miklu minni en“ (<<). Að því er varðar rannsókn sem er framkvæmd með 3% fóðrunarhlutfalli og helmingunartími hreinsunar er styttri en 3 dagar, og „verstu aðstæður“ α eru 1, er t.d. líklegt að fæðutengdur lífmögnunarhraðastuðull (BMF_K) verði undir u.þ.b. 0,13. Miðað við tilganginn með þessu mati og þá staðreynd að gildin verða varfærin í eðli sínu er ekki nauðsynlegt að leiðrétta þau m.t.t. þynningar vegna vaxtar eða fituefnainnihalds í fiskum og fóðri.

———

8. viðbætir

AÐFERÐIR TIL AÐ META LÍFÞÉTTNISTUÐLA TIL BRÁÐABIRGÐA ÚT FRÁ GÖGNUM SEM ER SAFNAÐ Í RANNSÓKNINNI Á FÆÐUTENGDUM VÁHRIFUM

Þessi prófunaraðferð felur í sér fæðutengda aðferð fyrir prófun á uppsöfnun efna í lífverum sem er í reynd ekki hægt að prófa með því að nota aðferðina með vatnstengdum váhrifum. Aðferðin með vatnstengdum váhrifum gefur lífþéttnistuðul, en fæðutengda aðferðin gefur beinar upplýsingar um lífmögnunargetu fóðurs. Í mörgum reglum um öryggi íðefna er gerð krafa um upplýsingar varðandi lífþéttni í vatni (t.d. í áhættumati og hnattsamræmdu kerfi til flokkunar). Þess vegna er þörf á að nota gögn sem fást úr fóðurrannsókn til að meta lífþéttnistuðul sem er samanburðarhæfur við prófanir sem eru framkvæmdar samkvæmt aðferðinni með vatnstengdum váhrifum ([1]). Í þessum hluta er farið yfir aðferðir sem hægt er að fylgja í þessu skyni en þó er viðurkennt að eðlislægir annmarkar eru á mötunum.

Í fóðurrannsókn er hreinsunin mæld til að fá hreinsunarhraðafasta, k_2. Ef hægt er að meta fasta fyrir upptökuhraða með þeim gögnum sem eru tiltæk fyrir aðstæður þar sem fiskarnir hafa orðið fyrir váhrifum af prófunarefni með vatni er einnig hægt að meta lífþéttnihraðastuðul.

Mat á fasta fyrir upptökuhraða vegna váhrifa af prófunarefni í vatni er háð mörgum forsendum sem stuðla allar að því að gera matið óáreiðanlegt. Enn fremur er gengið út frá því í þessari aðferð til að meta lífþéttnistuðul að heildarhraði hreinsunar (þ.m.t. áhrifaþættir s.s. dreifing í líkamanum og einstaklingsbundnir hreinsunarferlar) sé óháður váhrifatækninni sem er notuð til að framkalla líkamsálag af völdum prófunarefnis.

Hægt er að taka saman helstu eðlislægu forsendurnar, sem liggja að baki matinu, sem hér segir:

Hreinsun í kjölfar fæðutengdrar upptöku sé sú sama og hreinsun í kjölfar vatnstengdra váhrifa að því er varðar tiltekið efni.

Upptaka úr vatni muni fylgja hraðafræði af fyrstu gráðu.

Með hliðsjón af aðferðinni sem er notuð til að meta upptöku:

— upptaka geti haft fylgni við þyngd fiskanna eingöngu

— upptaka geti haft fylgni við deilistuðul efnisins fyrir oktanól og vatn eingöngu

— upptaka geti haft fylgni við sambland af þyngd fiska og deilistuðli efnisins fyrir oktanól og vatn

— þættir sem geta í reynd haft áhrif á upptöku í rannsókn á vatnstengdum váhrifum, s.s. lífaðgengi efnis, ásog á búnað, sameindastærð o.s.frv., hafi lítil áhrif

— og, það sem mestu máli skiptir:

gagnagrunnurinn (þjálfunaruppsetning), sem er notaður til að þróa aðferð til að meta upptöku, sé dæmigerður fyrir efnið sem verið er að meta

Í nokkrum útgefnum ritum í aðgengilegum heimildum hafa verið leiddar út jöfnur sem tengja saman upptöku hjá fiskum úr vatni gegnum tálknin við deilistuðul oktanóls og vatns fyrir efni, þyngd fiska (1.–4. heimild), magn og/eða fituefnainnihald, gegndræpi/flæði himna (5.–6. heimild), loftunarrúmmál fiska (7. heimild) og frávikshrýsting/massajöfnuðaraðferð (8.10. heimild). Nákvæmt mat á slíkum aðferðum í þessu samhengi er að finna í Crookes & Brooke (11. heimild). Útgefið efni frá Barber (12. heimild), þar sem er einblínt á líkan af uppsöfnun í lífverum gegnum fæðutengda upptöku, er einnig gagnlegt í þessu samhengi þar eð það inniheldur upplýsingar úr líkönum um upptökuhraða í gegnum tálkn. Hluti af bakgrunnsskjali með fæðutengdu aðferðarlýsingunni frá 2004 (13. heimild) var einnig helgað þessum þætti.

([1]) Í náttúrunni er líklegast að sú íkomuleið sem leiðir til mestu váhrifanna í vatnsumhverfinu, að því er varðar mjög vatnsfælin efni, sé inntaka og því er metinn lífþéttnistuðull strangt til tekið ekki dæmigerður fyrir uppsöfnunargetu slíks efnis í lífverum.

Flest þessara líkana virðast hafa verið leidd út með því að nota takmarkaða gagnagrunna. Að því er varðar tiltæka gagnagrunna sem voru notaðir til að byggja líkön á virðist sem þær tegundir efna sem voru notaðar séu oftast með svipaða uppbyggingu eða í svipuðum flokki (að því er varðar virkni, t.d. lífræn klórsambönd). Þetta, auk prófunarsértækra atriða s.s. tegunda, hitastigs o.s.frv., eykur á óvissuna sem fylgir því að nota líkan til að spá fyrir um upptökuhraðafasta fyrir aðra tegund efnis.

Í endurskoðun á fáanlegri tækni (11. heimild) var lögð áhersla á að engin ein aðferð væri „réttari“ en aðrar. Þess vegna skal færa skýr rök fyrir líkaninu sem er notað. Ef nokkrar aðferðir, sem hægt er að færa rök fyrir notkun á, eru tiltækar getur verið skynsamlegt að leggja fram nokkur möt á k_1 (og þar af leiðandi einnig á lífþéttnistuðli (BCF)) eða röð k_1-gilda (og lífþéttnistuðli) samkvæmt nokkrum aðferðum til að meta upptöku. Með tilliti til þess mismunar sem er á tegundum líkana og gagnasöfnum sem eru notuð til að þróa þau er þó ekki við hæfi að nota meðalgildi úr mötum sem eru leidd út á mismunandi hátt.

Sumir vísindamenn staðhæfa að mat á lífþéttnistuðli af þessu tagi útheimti leiðréttingu á lífaðgengi til að gera ráð fyrir ásogi efnis á uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) við aðstæður með vatnstengdum váhrifum til að samræma matið við niðurstöðurnar úr rannsóknum á vatnstengdum váhrifum (t.d. 13. og 14. heimild). Þó kann að vera að þessi leiðrétting eigi ekki við miðað við þau lágu gildi uppleysts, lífræns kolefnis sem krafist er í rannsókn á vatnstengdum váhrifum m.t.t. mats á „verstu aðstæðum“ (þ.e. hlutfallið milli lífaðgengilegs efnis og efnis eins og það er mælt í lausn). Að því er varðar mjög vatnsfælin efni getur upptaka í tálkn orðið takmörkuð vegna óvirks flæðis nálægt yfirborði tálknanna; í því tilviki er mögulegt að leiðréttingin verði á þeim áhrifum fremur en þeim sem hún var ætluð til.

Ráðlagt er að einblína á aðferðir sem útheimta ílag þar sem gögn eru auðfáanleg varðandi efni sem eru prófuð samkvæmt fóðurrannsókninni sem hér er lýst, (t.d. log K_{OW}, þyngd fiska). Nota má aðrar aðferðir sem útheimta flóknara ílag en þurfa e.t.v. viðbótarmælingar í prófuninni eða ítarlega þekkingu á prófunarefninu eða fisktegundunum sem eru e.t.v. ekki almennt aðgengilegar. Að auki getur val á líkani ráðist af fullgildingarstigi og notkunarsviði (sjá yfirlit og samanburð á mismunandi aðferðum í 11. heimild).

Það skal haft í huga að metið gildi k_1 sem af þessu leiðir og mat á lífmögnunarstuðli (BMF) eru ótrygg og e.t.v. þarf að meðhöndla þau í samræmi við aðferðina með vægi rökstuddra vísbendinga ásamt útleiddum lífmögnunarstuðli og efnisbreytum (t.d. sameindastærð) til að fá heildarmynd af uppsöfnunargetu efnis í lífverum. Túlkun og notkun á þessum þáttum getur ráðist af reglurammanum.

HEIMILDIR:

1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231“

———

17) Í stað kafla C.20 í C-hluta komi eftirfarandi:

„C.20 ***Æxlunarprófun á Daphnia magna***

INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 211 um prófanir (2012). OECD-viðmiðunarreglur um prófanir eru endurskoðaðar reglulega í ljósi framfara á sviði vísinda. Viðmiðunarregla 211 um æxlunarprófun er upprunnin úr viðmiðunarreglu 202 um prófanir, II. hluta, Æxlunarprófun á *Daphnia* sp. (1984). Almennt var viðurkennt að gögn úr prófunum sem voru framkvæmdar samkvæmt þessari viðmiðunarreglu 202 um prófanir gátu verið breytileg. Þetta leiddi til þess að töluverð vinna var lögð í að greina ástæðurnar fyrir þessum breytileika með það að markmiði að útfæra betri prófunaraðferð. Viðmiðunarregla 211 um prófanir byggist á niðurstöðum úr þessari rannsóknarvinnu, hringprófunum og fullgildingarrannsóknum sem fóru fram á árunum 1992 (1. heimild), 1994 (2. heimild) og 2008 (3. heimild).

Meginmunurinn á upphaflegri útgáfu (viðmiðunarreglu 202 um prófanir, 1984) og annarri útgáfu (viðmiðunarreglu 211 um prófanir, 1998) viðmiðunarreglu um æxlunarprófun er eftirfarandi:

— mælt er með notkun á tegundinni *Daphnia magna*,

— lengd prófunarinnar er 21 dagur,

— að því er varðar hálfkyrrstöðuprófanir hefur dýrum sem á að nota fyrir hvern prófunarstyrk verið fækkað úr minnst 40, helst skipt upp í fjóra hópa með 10 dýrum, niður í minnst 10 dýr, sem er haldið hverju fyrir sig, (en þó er hægt að nota mismunandi tilhögun fyrir gegnumstreymisprófanir),

— nákvæmari tillögur hafa verið gerðar að því er varðar prófunarmiðil og skilyrði við fóðrun,

— meginmunurinn á annarri útgáfu viðmiðunarreglu um æxlunarprófanir (viðmiðunarregla 211 um prófanir, 1998) og þessari útgáfu er eftirfarandi:

— viðbæti 7 hefur verið bætt við til að lýsa verkferlum til að sanngreina kyn nýfæddra, ef þörf krefur. Í samræmi við fyrri útgáfur þessarar prófunaraðferðar er kynjahlutfall valkvæður endapunktur,

— svarbreyta fyrir fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem lifir af, getur af sér, er komin með viðbótarsvarbreytu fyrir æxlun halaflóa, þ.e. heildarfjölda lifandi afkvæma við lok prófunar sem hvert undaneldisdýr getur af sér í upphafi prófunar, en undaneldisdýr sem drepast af slysförum eða fyrir slysni eru undanskilin greiningunni. Tilgangurinn með viðbættu svarbreytunni er að aðlaga þessa svarbreytu að öðrum aðferðum til æxlunarprófunar á hryggleysingjum. Í tengslum við þessa svarbreytu er enn fremur mögulegt að fjarlægja skekkjuvald í þessari prófunaraðferð, þ.e.a.s. áhrifin af því þegar undaneldisdýr drepast af slysförum eða fyrir slysni, ef slíkt gerist meðan váhrifatímabilið stendur yfir,

— tölfræðilegum viðbótarleiðbeiningum um tilhögun prófunar og úrvinnslu niðurstaðna hefur verið bætt við, bæði fyrir ECx (t.d. EC_{10} eða EC_{50}) og fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC)/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC),

— markprófun er tekin upp.

Skilgreiningar sem eru notaðar eru gefnar upp í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Meginmarkmiðið með þessari prófun er að meta áhrif íðefna á viðkomu *Daphnia magna*. Í þessu skyni eru ungar, kvenkyns halaflær (undaneldisdýr), sem eru innan við 24 klukkustunda gamlar þegar prófun hefst, látnar verða fyrir váhrifum af prófunaríðefni sem er bætt út í vatn í röð styrkbila. Lengd prófunarinnar er 21 dagur. Við lok prófunar er heildarfjöldi lifandi afkvæma, sem verða til, metinn. Viðkomu undaneldisdýra má gefa upp á annan hátt (t.d. sem fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr getur af sér á dag frá þeim degi að telja að fyrst varð vart við afkvæmi) en gera skal grein fyrir því auk heildarfjölda lifandi afkvæma, sem verða til, sem er á lífi í lok prófunarinnar. Vegna sérstakrar tilhögunar hálfkyrrstöðuprófunarinnar, samanborið við aðrar aðferðir til æxlunarprófunar á hryggleysingjum, er einnig mögulegt að telja fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr fyrir sig getur af sér. Öfugt við aðrar aðferðir til æxlunarprófunar á hryggleysingjum þýðir þetta að ef undaneldisdýr drepst af slysförum og/eða fyrir slysni meðan á prófunartímabilinu stendur er hægt að undanskilja afkvæmi þess frá mati á gögnum. Ef undaneldisdýr drepst í samhliða prófun sem varð fyrir váhrifum skal þar af leiðandi íhuga hvort dauðsfallið fylgir styrkháðu mynstri eða ekki, t.d. hvort um er að ræða marktækt aðhvarf svörunar á móti styrk prófunaríðefnisins með jákvæðri hallatölu (hægt er að nota tölfræðilega prófun, s.s. leitniprófun Cochran-Armitage, til þess). Ef dauðsfallið fylgir ekki styrkháðu mynstri skal undanskilja þessar samhliða prófanir, þar sem undaneldisdýr drepst, frá greiningu á prófunarniðurstöðum. Ef dauðsfall undaneldisdýrs fylgir styrkháðu mynstri skal dauðsfallið flokkað undir áhrif af prófunaríðefninu og samhliða prófanirnar skulu ekki útilokaðar frá greiningunni. Ef undaneldisdýr drepst í prófuninni, þ.e. fyrir slysni vegna óhönduglegrar meðferðar eða af slysförum eða fyrir slysni vegna óútskýrðs atviks sem tengist ekki áhrifum prófunaríðefnisins eða í ljós kemur að dýrið er karlkyns, er samhliða prófunin útilokuð frá greiningunni (sjá nánar í 51. lið). Eiturhrif prófunaríðefnisins á viðkomu eru gefin upp sem ECx með því að setja gögnin upp í viðeigandi líkan með ólínulegu aðhvarfi, til að meta styrkinn sem veldur x% minnkun í viðkomu, eftir því sem við á, eða sem gildi styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif/styrks sem hefur merkjanleg áhrif (4. heimild). *Lægsti hrifstyrkur sem er notaður (t.d. EC_{10}) skal helst liggja innan styrkleikanna í prófuninni sem þýðir að þetta gildi er reiknað út með innreikningi en ekki framreikningi.*

Einnig skal greina frá lifun undaneldisdýranna og tímanum fram að fyrstu afkvæmum. Einnig má rannsaka önnur íðefnatengd áhrif á mæliþætti, s.s. vöxt (t.d. lengd) og jafnvel vaxtarhraða stofnsins (sjá 44. lið).

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

Niðurstöður úr prófun á bráðum eiturhrifum (sjá kafla C.2 í þessum viðauka: Prófun á bráðri sviptingu á hreyfigetu *Daphnia* sp.), sem er framkvæmd með *Daphnia magna*, getur verið gagnleg við val á viðeigandi röð prófunarstyrkleika í æxlunarprófunum. Vatnsleysni og gufuþrýstingur prófunaríðefnisins skulu vera þekkt og áreiðanleg greiningaraðferð fyrir magngreiningu íðefnisins í prófunarlausnunum, með skráða endurheimtargetu og magngreiningarmörk, fyrir hendi.

Upplýsingar um prófunaríðefnið, sem geta verið gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki íðefnisins, stöðugleiki í ljósi, stöðugleiki við prófunarskilyrðin, pKa, P_{ow} og niðurstöður prófunar á auðlífbrjótanleika (sjá kafla C.4 (Ákvörðun á auðlífbrjótanleika) og C.29 (Auðlífbrjótanleiki — koltvísýringur í lokuðum ílátum) í þessum viðauka).

GILDI PRÓFUNARINNAR

Til að prófun teljist gild skal samanburðarhópurinn eða hóparnir uppfylla eftirfarandi viðmiðanir:

— dánarhlutfall hjá undaneldisdýrunum (kvenkyns halaflóm) er ekki meira en 20% við lok prófunar,

— meðalfjöldi lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem er á lífi í lok prófunar, getur af sér er ≥ 60.

Athugasemd: Hægt er að nota sömu gildisviðmiðun (20%) fyrir dauða undaneldisdýra af slysförum og fyrir slysni í samanburðarhópunum sem og fyrir hvern prófunarstyrk fyrir sig.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

Prófunarílát og annar búnaður sem kemst í snertingu við prófunarlausnirnar skulu eingöngu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Alla jafna eru prófunarílátin bikarglös úr gleri.

Auk þess verður þörf fyrir eftirfarandi búnað, að hluta eða öllu leyti:

— súrefnismæli (með örskauti eða öðrum hentugum búnaði til að mæla uppleyst súrefni í sýnum með lítið rúmmál),

— fullnægjandi búnað til hitastýringar,

— sýrustigsmæli,

— búnað til að ákvarða hörku vatns,

— búnað til að ákvarða heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) í vatni eða búnaði til að ákvarða efnafræðilega súrefnisþörf (COD),

— fullnægjandi búnað til að stjórna lýsingu og mæla ljósstyrk.

Prófunarlífvera

Í prófuninni skal nota tegundina *Daphnia magna* Straus ([1]).

Helst skal klónið hafa verið sanngreint með arfgerðargreiningu. Rannsóknir (1. heimild) hafa leitt í ljós að tímgunargeta klónsins A (sem kemur frá IRCHA í Frakklandi) (5. heimild) uppfyllir ávallt gildisviðmiðun um meðaltalið ≥ 60 lifandi afkvæmi á hvert undaneldisdýr sem lifir prófunina af þegar það er ræktað við þau skilyrði sem er lýst í þessari prófunaraðferð. Þó má nota önnur klón að því tilskildu að sýnt sé fram á að halaflóaræktunin uppfylli gildisviðmiðanir fyrir prófunina.

([1]) Nota má aðrar tegundir halaflóa svo fremi að þær uppfylli gildisviðmiðanir eins og við á (gildisviðmiðun, sem varðar viðkomu í samanburðarhópunum, skiptir máli fyrir allar tegundir). Ef aðrar tegundir halaflóa er notaðar skal koma skýrt fram hverjar þær eru og notkun þeirra skal rökstudd.

Í upphafi prófunar skulu dýrin vera yngri en 24 klukkustunda og skulu ekki vera afkvæmi fyrstu afkvæma. Þær skulu vera úr heilbrigðum stofni (þ.e. ekki sýna nein merki um streitu, s.s. háa dánartíðni, karldýr og söðulhýði, seinkun á tilkomu fyrstu afkvæma, mislit dýr o.s.frv.). Stofndýrin skulu haldin við sambærileg ræktunarskilyrði (lýsing, hitastig, miðill, fóðrun og dýr á hverja rúmmálseiningu) og þau sem nota skal í prófuninni. Ef ræktunarmiðill halaflónna sem á að nota í prófuninni er annar miðill en er notaður í venjubundinni halaflóaræktun er það góð starfsvenja að bæta við aðlögunartímabili fyrir prófunina, sem er að jafnaði þrjár vikur (þ.e. ein kynslóð), til að varna því að streita herji á undaneldisdýrin.

Prófunarmiðill

Mælt er með að nota fullskilgreindan miðil í þessari prófun. Með því má komast hjá notkun aukefna, sem er erfitt að lýsa (t.d. þangi og þara, jarðvegsútdrætti), og bæta þannig möguleikana á stöðlun milli rannsóknarstofa. Í þessu skyni hefur miðillinn Elendt M4 (6. heimild) og M7 (sjá 2. viðbæti) reynst vel. Þó má nota aðra miðla (t.d. 7. og 8. heimild) að því tilskildu að sýnt sé fram á að árangur halaflóaræktunarinnar uppfylli gildisviðmiðanir prófunarinnar.

Ef notaðir eru miðlar sem innihalda óskilgreind aukefni skal tilgreina þessi aukefni á ótvíræðan hátt og gefa upplýsingar um samsetningu þeirra í prófunarskýrslunni, einkum að því er varðar kolefnisinnihald þar eð það getur orðið viðbót við fæðuna sem gefin er. Mælt er með því að ákvarða heildarmagn lífræns kolefnis og/eða efnafræðilega súrefnisþörf í stofnlausn lífræna aukefnisins og meta síðan viðbótina sem af því leiðir á heildarmagn lífræns kolefnis og/eða efnafræðilega súrefnisþörf í prófunarmiðlinum. Enn fremur er mælt með því að heildarmagn lífræns kolefnis í miðlinum (þ.e. áður en þörungunum er bætt við) sé undir 2 mg/l (9. heimild).

Við prófun íðefna, sem innihalda málma, er mikilvægt að gera sér grein fyrir því að eiginleikar prófunarmiðilsins (t.d. harka og klóbindihæfni) geta haft áhrif á eiturhrif prófunaríðefnisins. Því er æskilegt að notaður sé fullskilgreindur miðill. Sem stendur eru Elendt M4 og M7 þó einu dæmin um fullskilgreindan miðil sem vitað er að henta til langtímaræktunar halaflóa af tegundinni *Daphnia magna*. Báðir miðlar innihalda klóbindiefnið etýlendíamíntetraasetat (EDTA). Rannsóknir hafa sýnt (2. heimild) að „sýndareiturhrif“ kadmíums eru að jafnaði minni þegar æxlunarprófunin fer fram í miðlunum M4 og M7 en í miðlum sem innihalda ekki etýlendíamíntetraasetat. Því er ekki mælt með að nota M4 og M7 til að prófa íðefni sem innihalda málma og einnig skal forðast aðra miðla sem innihalda þekkt klóbindiefni. Þegar um er að ræða íðefni sem innihalda málma getur verið ráðlegt að nota annan miðil, t.d. endurgert, hart ferskvatn samkvæmt ASTM (9. heimild), sem inniheldur ekki etýlendíamíntetraasetat. Þessi samsetning af endurgerðu, hörðu ferskvatni samkvæmt ASTM og útdrætti úr þangi og þara (10. heimild) hentar fyrir langtímaræktun *Daphnia magna* (2. heimild).

Styrkur uppleysts súrefnis skal vera yfir 3 mg/l við upphaf prófunarinnar og meðan á henni stendur. pH-gildi skal vera á bilinu 6–9 og frávik skal að jafnaði ekki vera meira en 1,5 einingar í hverri einstakri prófun. Mælt er með því að harka sé yfir 140 mg/l (sem $CaCO_3$). Prófanir með þessu gildi og þar yfir hafa leitt í ljós tímgunargetu sem er í samræmi við gildisviðmiðanirnar (11. og 12. heimild).

Prófunarlausnir

Prófunarlausnir með styrknum sem valinn hefur verið eru yfirleitt búnar til með því að þynna stofnlausn. Æskilegast er að tilreiða stofnlausnir án þess að nota leysa eða dreifiefni, ef unnt er, með því að blanda prófunaríðefninu eða hrista það saman við prófunarmiðilinn á vélrænan hátt s.s. með hræri- eða úthljóðsbúnaði eða öðrum viðeigandi aðferðum. Ákjósanlegt er að láta prófunarkerfin komast í snertingu við þá styrkleika prófunaríðefnisins sem á að nota í rannsóknninni, eins lengi og þörf krefur til að sýna fram á að styrkur váhrifanna breytist ekki meðan á prófun stendur, áður en prófunarlífverunum er bætt við. Ef erfitt er að leysa prófunaríðefni upp í vatni skal fylgja verkferlum sem lýst er í leiðbeiningum Efnahags- og framfarastofnunarinnar um meðhöndlun efna sem erfitt er að gera prófanir á (e. *OECD Guidance for handling difficult substances*) (13. heimild). Forðast skal notkun leysa eða dreifiefna en það kann þó að vera nauðsynlegt í tilteknum tilvikum til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika til skömmtunar.

Keyra skal nægilega margar samanburðarprófanir með þynningarvatni og, ef ekki er hægt að komast hjá því, nægilega margar samanburðarprófanir með leysi til viðbótar við prófunarstyrkleikana. Einungis skal nota leysa eða dreifiefni, sem hafa verið rannsökuð og sýnt fram á að hafi ekki veruleg áhrif eða einungis lítilsháttar áhrif á svarbreytuna, í prófuninni. Dæmi um heppilega leysa (t.d. aseton, etanól, metanól, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól) og dreifiefni (t.d. Cremophor RH40, metýlsellulósi 0,01% og HCO-40) er að finna í 13. heimild. Þegar leysir eða dreifiefni eru notuð skal lokastyrkur þeirra ekki vera hærri en 0,1 ml/l (13. heimild) og nota skal sama styrk í öllum prófunarkerjum nema í samanburðarkerjum með þynningarvatni. Þó skal reyna, eftir því sem unnt er, að halda styrk leysis í lágmarki.

VERKFERLI

Váhrifaskilyrði

Tímalengd

Lengd prófunarinnar er 21 dagur.

Hleðsla

Undaneldisdýrum er haldið aðskildum, einu í hverju prófunaríláti, alla jafna með 50–100 ml af miðli í hverju íláti (að því er varðar *Daphnia magna* er mögulegt að nota minna magn af miðli í hverju íláti, einkum fyrir smærri tegundir, t.d. *Ceriodaphnia dubia*), nema nauðsynlegt sé að nota gegnumstreymistilhögun við prófunina.

Stundum útheimtir greiningaraðferðin, sem er notuð til að ákvarða styrk prófunaríðefnisins, meira rúmmál þó að einnig sé heimilt að sameina samhliða sýni til efnagreiningar. Ef rúmmálið er yfir 100 ml þarf að auka skammtinn sem halaflónum er gefinn til að tryggja næga fæðu og samræmi við gildisviðmiðanir.

Tilraunadýr

Við hálfkyrrstöðuprófanir skal nota a.m.k. 10 dýr, sem er haldið aðskildum, fyrir hvern prófunarstyrkleika og a.m.k. 10 dýr sem er haldið aðskildum í samanburðarröðunum.

Við gegnumstreymisprófanir hefur reynst hentugt (1. heimild) að nota 40 dýr, sem skipt er í fjóra hópa með 10 dýrum í hópi, fyrir hvern prófunarstyrkleika. Nota má færri prófunarlífverur og mælt er með að lágmarki 20 dýrum fyrir hvern styrkleika, skipt í tvö eða fleiri samhliða sýni með jöfnum fjölda dýra (t.d. fjögur samhliða sýni, hvert um sig með fimm halaflóm). Veita skal því athygli að í prófunum, þar sem dýrin eru haldin í hópum, verður ekki unnt að útiloka afkvæmi frá tölfræðilegum greiningum ef undaneldisdýr drepst fyrir slysni/af slysförum þegar æxlun er hafin og í þeim tilvikum skal þar af leiðandi gefa viðkomuna upp sem heildarfjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem er fyrir hendi í upphafi prófunar, getur af sér.

Nota skal slembiaðferð við ísetningu í prófunarílátin og alla síðari meðhöndlun þeirra. Sé það ekki gert getur það valdið bjögun sem hægt er að túlka sem áhrif á styrkleika. Einkum geta áhrif sem tengjast tíma, s.s. þreyta starfsmanns eða aðrar skekkjur, leitt til meiri áhrifa við meiri styrkleika ef tilraunaeiningar eru meðhöndlaðar í meðhöndlunar- eða styrkleikaröð. Ef líklegt er að aðstæður í upphafi eða umhverfisaðstæður við prófunina, s.s. staðsetning í rannsóknarstofunni, hafi áhrif á prófunarniðurstöður skal vega það og meta að skipta prófuninni niður í blokkir.

Fóðrun

Við hálfkyrrstöðuprófanir skal helst fóðra daglega og a.m.k. þrisvar í viku (þ.e. við skipti á miðlum). Taka skal tillit til hugsanlegrar þynningar váhrifastyrkleika þegar fóðri er bætt í og forðast slíkt eins og frekast er unnt með því að nota óblandaðar þörungasviflausnir. Greina skal frá frávikum frá þessu (t.d. í gegnumstreymisprófunum).

Fæða undaneldisdýranna í prófuninni skal helst vera einhver af eftirfarandi tegundum lifandi þörungafrumna, ein eða fleiri: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (áður *Selenastrum capricornutum*) og *Desmodesmus subspicatus* (áður *Scenedesmus subspicatus*). Fæðan, sem er gefin, skal miðast við magn lífræns kolefnis (C) sem kemur í hlut hvers undaneldisdýrs. Rannsóknir (14. heimild) hafa sýnt að fyrir tegundina *Daphnia magna* nægir 0,1 til 0,2 mg skammtur af kolefni á hverja halafló á dag til að fá tilskilinn fjölda lifandi afkvæma til að uppfylla gildisviðmiðanir prófunarinnar. Skammtinn má gefa annaðhvort í jöfnu magni allan prófunartímann eða, ef vill, í minna magni í byrjun sem er síðan aukið í prófuninni til að taka tillit til vaxtar undaneldisdýranna. Í því tilviki skal skammturinn þó ávallt haldast innan ráðlagða bilsins sem er ætíð 0,1–0,2 kolefnis á hverja halafló á dag.

Ef nota á staðgöngumælingar, s.s. fjölda þörungafrumna eða ljósgleypni, til að fóðra með tilskildum skammti (þ.e. til hægðarauka því að mælingar á kolefnisinnihaldi eru tímafrekar), skal hver rannsóknarstofa búa til sitt eigið venslarit sem tengir staðgöngumælinguna við kolefnisinnihaldið í þörungaræktinni (sjá ráðleggingar um gerð venslarits í 3. viðbæti). Venslarit skulu prófuð a.m.k. árlega og oftar ef skilyrði í þörungarækt hafa breyst. Ljósgleypni hefur reynst betur til staðgöngumælingar á kolefnisinnihaldi en frumufjöldi (15. heimild).

Fóðra skal halaflærnar á óblandaðri þörungasviflausn til að rúmmál þörungaræktunarmiðils, sem er flutt yfir í prófunarílátin, verði sem minnst. Þörungalausnina má þykkja með skilvindu og síðan er lausnin enduruppleyst í ræktunarmiðli halaflónna.

Lýsing

Lýsing í 16 klukkustundir í styrk sem fer ekki yfir 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mælt við vatnsyfirborð ílátsins. Ef notuð eru ljósmælitæki sem eru kvörðuð í lúxum samsvarar sviðið fyrir kalt, hvítt ljós, 1 000–1 500 lúx, nálægt ráðlagða ljósstyrknum 15-20 $\mu E \cdot m-2 \cdot s-1$.

Hitastig

Hitastig prófunarmiðilsins skal vera á bilinu 18–22 °C. Ef unnt er skal hitastigið í hverri einstakri prófun þó aldrei sveiflast meira en 2 °C innan þessara marka (t.d. 18–20, 19–21 eða 20–22 °C) daglega. Það getur verið heppilegt að nota viðbótarprófunarílát til að vakta hitastig.

Loftun

Ekki skal lofta prófunarílátin meðan á prófuninni stendur.

Tilhögun prófunar

Skammtastærðarrannsókn

Ef nauðsyn krefur er framkvæmd skammtastærðarrannsókn, t.d. með fimm styrkleikum prófunaríðefnis, og tvær samhliða prófanir fyrir hverja meðhöndlun og samanburðarprófun. Viðbótarupplýsingar úr prófunum með svipuðum íðefnum eða úr heimildum um langvinn eiturhrif á halaflær og/eða á aðrar lagarlífverur geta einnig verið gagnlegar við að ákveða styrkbil til að nota í skammtastærðarrannsókninni.

Tímalengd skammtastærðarrannsóknar er 21 dagur eða nægilega löng til að spá með vissu fyrir um áhrifagildi. Við lok prófunarinnar er dánartíðni halaflónna metin. Skrá skal fjölda undaneldisdýra og hvort afkvæmi eru fyrir hendi.

Endanleg prófun

Alla jafna skulu vera a.m.k. fimm prófunarstyrkleikar, sem liggja innan styrkbils fyrir hrifstyrkinn (t.d. EC_x), og raðað í jafnhlutfallaröð og æskilegt er að bilin milli þeirra greinist að með stuðli sem fer ekki yfir 3,2 og nota skal viðeigandi fjölda samhliða sýna fyrir hvern prófunarstyrk (sjá 24.–25. lið). Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Íðefni skulu ekki prófuð við styrkleika sem er meiri en sem nemur leysnimörkum þeirra í prófunarmiðlinum. Áður en tilraunin er gerð er ráðlegt að íhuga tölfræðilegan styrk prófunartilhögunarinnar og nota viðeigandi tölfræðiaðferðir (4. heimild). Við ákvörðun á röð styrkbila skal hafa eftirfarandi í huga:

i) Þegar EC_x fyrir áhrif á æxlun er áætlað er ráðlegt að nota nægan styrkleika til að skilgreina EC_x með viðeigandi öryggismörkum. Prófunarstyrkleikar sem eru notaðir skulu helst liggja innan áætlaðs EC_x þannig að EC_x sé fundið með innreikningi fremur en framreikningi. Það er kostur fyrir tölfræðilegar greiningar, sem á eftir koma, að nota fleiri prófunarstyrkleika (t.d. 10) og færri samhliða prófanir fyrir hvern styrk (t.d. 5 þannig að heildarfjöldi íláta verði sá sami) og 10 samanburðarílát.

ii) Við ákvörðun á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og/eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal minnsti prófunarstyrkurinn vera svo lítill að viðkoma við þann styrk sé ekki marktækt minni en í samanburðarhópnum. Ef svo er ekki skal endurtaka prófunina og minnka minnsta styrkleikann.

iii) Við ákvörðun á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og/eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal mesti prófunarstyrkurinn vera svo hár að viðkoma við þann styrk sé marktækt minni en í samanburðarhópnum. Ef svo er ekki skal endurtaka prófunina og auka mesta styrkleikann nema mesti prófunarstyrkur, sem þörf er á til prófunar á langvinnum áhrifum (þ.e. 10 mg/l), hafi verið notaður sem hæsti prófunarstyrkur í upphafsprófuninni.

Ef engin áhrif eru merkjanleg við hæsta styrk í skammtastærðarrannsókn (t.d. við 10 mg/l) eða þegar líklegt er að prófunaríðefnið hafi lítil/engin eiturhrif, byggt á skorti á eiturhrifum á aðrar lífverur og/eða lítilli/engri upptöku, má framkvæma æxlunarprófunina sem markprófun og nota prófunarstyrk, sem nemur t.d. 10 mg/l, og samanburðinn. Nota skal 10 samhliða prófanir fyrir bæði meðferðar- og samanburðarhópana. Ef þörf er á að gera markprófun í gegnumstreymiskerfi ættu færri samhliða prófanir að nægja. Markprófun gefur færi á að sýna fram á að við markstyrkinn séu engin tölfræðilega marktæk áhrif en ef áhrif koma í ljós er alla jafna gerð krafa um heildarprófun.

Samanburðir

Keyra skal eina samanburðarröð með prófunarmiðlinum og einnig, ef við á, eina samanburðarröð með leysinum eða dreifiefninu til viðbótar við prófunarröðina. Ef notaður er leysir eða dreifiefni skal styrkleikinn vera sá sami og er notaður í ílátunum með prófunaríðefninu. Nota skal viðeigandi fjölda samhliða sýna (sjá 23.–24. lið).

Í vel útfærðum prófunum á fráviksstuðull frá meðalfjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr getur af sér í samanburðarprófun(um) að jafnaði að vera ≤ 25% og skal gera grein fyrir þessu ef tilhögun prófunar er þannig að dýrunum er haldið aðskildum.

Endurnýjun prófunarmiðils

Hversu oft miðillinn er endurnýjaður ræðst af stöðugleika prófunaríðefnisins en þó skal hann endurnýjaður a.m.k. þrisvar í viku. Ef áður gerðar forprófanir á stöðugleika (sjá 7. lið) hafa leitt í ljós að styrkur prófunaríðefnisins er ekki stöðugur (þ.e. utan bilsins 80–120% af nafnstyrk eða fellur undir 80% af mældum upphafsstyrk) á hámarkstíma til endurnýjunar (þ.e. þrír dagar) skal vega það og meta hvort endurnýja skuli miðilinn oftar eða nota gegnumstreymisprófun.

Þegar miðillinn er endurnýjaður í hálfkyrrstöðuprófunum er útbúin önnur röð prófunaríláta og undaneldisdýrin færð yfir í þau, t.d. með glerpípettu með hæfilegu þvermáli. Rúmmál miðilsins, sem er fært á milli með halaflónum, skal vera í lágmarki.

Athuganir

Niðurstöður athugana, sem gerðar eru meðan á prófun stendur, skulu skráðar á gagnablöð (sjá dæmi í 4. og 5. viðbæti). Sé annarra mælinga krafist (sjá 44. lið) kann að vera þörf á frekari athugunum.

Afkvæmi

Afkvæmin, sem hvert undaneldisdýr getur af sér, skulu helst fjarlægð og talin daglega frá því að fyrstu afkvæmi koma fram til að koma í veg fyrir að þau éti fæðuna sem ætluð er undaneldisdýrinu. Að því er varðar þessa prófunaraðferð þarf einungis að telja fjölda lifandi afkvæma en skrá skal öll egg sem ekki klekjast út eða dauð afkvæmi sem eru til staðar.

Dánartíðni

Dánartíðni hjá undaneldisdýrum skal helst skráð daglega eða a.m.k. jafn oft og afkvæmin eru talin.

Aðrir mæliþættir

Þó að þessi prófunaraðferð sé fyrst og fremst ætluð til að meta áhrif á viðkomu er hugsanlegt að önnur áhrif komi svo vel í ljós að hægt sé að gera tölfræðilega greiningu. Hægt er að skrá viðkomu á hvert undaneldisdýr sem lifir af, þ.e. fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem lifir af, getur af sér í prófuninni. Þetta er hægt að bera saman við helstu svarbreytuna (viðkoma á hvert undaneldisdýr við upphaf prófunar, sem drapst ekki fyrir slysni eða af slysförum í prófuninni). Ef undaneldisdýr drepst í samhliða prófun sem varð fyrir váhrifum skal íhuga hvort dauðsfallið fylgir styrkháðu mynstri eða ekki, t.d. hvort um er að ræða marktækt aðhvarf svörunar á móti styrk prófunaríðefnisins með jákvæðri hallatölu (hægt er að nota tölfræðipróf, s.s. leitniprófun Cochran-Armitage, til þess). Ef dauðsfallið fylgir ekki styrkháðu mynstri skal undanskilja þessar samhliða prófanir, þar sem undaneldisdýr drepst, frá greiningu á prófunarniðurstöðum. Ef dauðsfall undaneldisdýrs fylgir styrkháðu mynstri skal dauðsfallið flokkað undir áhrif af prófunaríðefninu og samhliða prófanirnar skulu ekki útilokaðar frá greiningunni á prófunarniðurstöðunum. Vaxtarmælingar eru mjög æskilegar þar eð þær veita upplýsingar um möguleg nær banvæn áhrif, sem geta verið gagnlegar til viðbótar við mælingar á æxlun eingöngu; mælt er með mælingum á lengd undaneldisdýranna (þ.e. lengd bols að frátöldum halanum) við lok prófunarinnar. Aðrir mæliþættir, sem hægt er að mæla eða reikna, eru m.a. tíminn fram að fyrstu afkvæmum (og síðari afkvæmum), fjöldi og stærð afkvæma á hvert dýr, fjöldi afkvæma sem klekjast ekki út, hvort nýfædd karldýr (OECD, 2008) eða söðulhýði eru fyrir hendi og hugsanlega vaxtarhraði stofnsins (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti og greiningar á kyni nýfæddra í 7. viðbæti).

Tíðni magngreininga og mælinga

Mæla skal súrefnisstyrk, hitastig, hörku og sýrustig a.m.k. einu sinni í viku í nýjum og gömlum miðlum, í samanburðarhóp eða hópum og í mesta styrk prófunaríðefnisins.

Í prófuninni er styrkleiki prófunaríðefnisins ákvarðaður með reglulegu millibili.

Í hálfkyrrstöðuprófunum þar sem þess er vænst að styrkur prófunaríðefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk (þ.e. innan bilsins 80–120%; sjá 6., 7. og 39. lið) er mælt með því að greina a.m.k. hæsta og lægsta prófunarstyrkleika þegar lausn er nýtilreidd og einu sinni við endurnýjun í fyrstu prófunarviku (þ.e. gera skal greiningu á sýni úr sömu lausninni — þegar hún er nýtilreidd og við endurnýjun). Þessar ákvarðanir skulu endurteknar a.m.k. vikulega eftir það.

Í prófunum þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunaríðefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk er nauðsynlegt að greina alla prófunarstyrkleika þegar lausnir eru nýtilreiddar og við endurnýjun. Í prófunum, þar sem mældur upphafsstyrkur prófunaríðefnis liggur utan markanna ± 20% af nafnstyrk en sýna má fram á endurtekningarnákvæmni og stöðugleika upphaflegs styrkleika (þ.e. innan markanna 80–120% af upphaflegum styrkleika), er hins vegar hægt að fækka efnafræðilegum mælingum í 2. og 3. prófunarviku og ekki mæla nema hæsta og lægsta prófunarstyrk. Í öllum tilvikum þarf ákvörðun á styrkleikum prófunaríðefnis fyrir endurnýjun aðeins að fara fram í einu samhliða prófunaríláti fyrir hvern prófunarstyrk.

Ef gegnumstreymisprófun er notuð hentar að nota svipaða sýnatökuáætlun og lýst er fyrir hálfkyrrstöðuprófanir (en mælingar á „gömlum“ lausnum eiga ekki við í þessu tilviki). Þó getur verið ráðlegt að auka fjölda þeirra skipta þar sem sýni eru tekin í fyrstu vikunni (t.d. þrennar mælingar) til að tryggja að prófunarstyrkur haldist stöðugur. Í prófunum af þessari tegund skal athuga streymi þynningarefnis og prófunaríðefnis daglega.

Ef unnt er að sýna fram á að styrkur íðefnis, sem verið er að prófa, hafi örugglega haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni er heimilt að niðurstöðurnar grundvallist hvort sem er á nafngildi eða mældu upphafsgildi. Ef frávik frá nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk er utan markanna ± 20% skal gefa niðurstöðurnar upp sem tímavegið meðaltal (sjá leiðbeiningar um útreikninga í 6. viðbæti).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

Tilgangurinn með þessari prófun er að ákvarða áhrif prófunaríðefnis á viðkomu. Reikna skal heildarfjölda lifandi afkvæma á hvert undaneldisdýr fyrir hvert prófunarílát (þ.e. samhliða prófun). Auk þess er hægt að reikna út æxlun á grundvelli lifandi afkvæma sem undaneldisdýr, sem lifa af, geta af sér. Sú svarbreyta sem skiptir mestu máli vistfræðilega séð er þó heildarfjöldi lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem drepst ekki af slysförum ([1]) eða fyrir slysni ([2]), getur af sér í prófuninni. Ef undaneldisdýr drepst af slysförum eða fyrir slysni í prófuninni eða í ljós kemur að það er karlkyns er samhliða prófunin útilokuð úr greiningunni. Greiningin byggist þá á færri samhliða prófunum. Ef undaneldisdýr drepst í samhliða prófun sem varð fyrir váhrifum skal íhuga hvort dauðsfallið fylgir styrkháðu mynstri eða ekki, t.d. hvort um er að ræða marktækt aðhvarf svörunar á móti styrk prófunaríðefnisins með jákvæðri hallatölu (hægt er að nota tölfræðipróf, s.s. leitniprófun Cochran-Armitage, til þess). Ef dauðsfallið fylgir ekki styrkháðu mynstri skal undanskilja þessar samhliða prófanir, þar sem undaneldisdýr drepst, frá greiningu á prófunarniðurstöðum. Ef dauðsfall undaneldisdýrs fylgir styrkháðu mynstri skal dauðsfallið flokkað undir áhrif af prófunaríðefninu og samhliða prófanirnar skulu ekki útilokaðar frá greiningunni á prófunarniðurstöðunum.

Samantekt: þegar minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif eða EC_x eru notuð til að gefa upp áhrif er mælt með að reikna út áhrif á æxlun með því að nota báðar svarbreyturnar, sem getið er hér að ofan, þ.e.

— sem heildarfjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem drepst ekki af slysförum eða fyrir slysni í prófuninni, getur af sér og

— sem fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem lifir af, getur af sér,

og síðan eru lægstu gildi styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrks sem hefur merkjanleg áhrif eða EC_x reiknuð út með því að nota aðra hvora svarbreytuna og notuð sem lokaniðurstaða.

Áður en tölfræðileg greining er gerð, t.d. dreifnigreiningar, samanburður á meðferðar- og samanburðarhópum með t-prófun, Dunnett-prófun, Williams-prófun eða Jonckheere-Terpstra-prófun með stiglækkun, er mælt með að athuga hvort þörf er á umbreytingu á gögnum til að uppfylla kröfur í tilteknu tölfræðiprófi. Hægt er að íhuga að nota Dunns-prófun eða Mann-Whitney-prófun sem stikalausan staðgöngukost. Reiknuð eru út 95% öryggisbil fyrir hvert meðaltal meðferðarprófana.

([1]) Dauðsfall af slysförum: dauðsfall, ekki íðefnatengt, af völdum slyss (þ.e. þekkt orsök).
([2]) Dauðsfall fyrir slysni: dauðsfall, ekki íðefnatengt, af óþekktum orsökum

Fjöldi undaneldisdýra sem lifir af í ómeðhöndluðum samanburðarprófunum er gildisviðmiðunarforsenda og skal skjalfestur og gerð grein fyrir honum. Einnig skal gera grein fyrir öllum öðrum skaðlegum áhrifum, t.d. óeðlilegu atferli og umtalsverðum eiturverkunum, í lokaskýrslunni.

ECx

ECx-gildi, þ.m.t. tilheyrandi neðri og efri öryggismörk, eru reiknuð út með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. umhverfðri jöfnu eða Weibull-jöfnu, klipptri Spearman-Karber-aðferðinni eða einföldum innreikningi). Til að reikna út EC_{10}, EC_{50} eða annan ECx skulu fullnaðargögnin sett í aðhvarfsgreiningu.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif

Ef ætlunin er að nota tölfræðilega greiningu til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif/minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal nota viðeigandi tölfræðiaðferðir samkvæmt skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif: Leiðbeiningar fyrir notkun (e. *OECD Document 54 on the Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*) (4. heimild). Skaðleg áhrif prófunaríðefnisins samanborið við samanburðarprófunina eru yfirleitt rannsökuð með því að nota einhliða tilgátuprófun við $p \leq 0{,}05$.

Hægt er að prófa normaldreifingu og einsleitni dreifni með því að nota hentuga tölfræðilega prófun, t.d. Shapiro-Wilk-prófun og Levene-prófun, eftir því sem við á ($p \leq 0{,}05$). Hægt er að framkvæma einhliða dreifnigreiningu (ANOVA) og síðan margfaldar samanburðarprófanir. Hægt er að nota margþættan samanburð (t.d. próf Dunnetts) eða leitniprófun með stiglækkun (t.d. Williams-prófun eða Jonckheere-Terpstra-prófun með stiglækkun) til að reikna út hvort það er marktækur munur ($p \leq 0{,}05$) á milli samanburðar og hinna ýmsu styrkleika prófunaríðefnisins (val á tillagðri prófun samkvæmt leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 54 (4. heimild)). Að öðrum kosti er hægt að nota stikalausar aðferðir (t.d. Bonferroni-U-próf samkvæmt Holm eða Jonckheere-Terpstra-leitniprófun) til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif og minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif.

Markprófun

Ef markprófun (samanburður á einungis einu samanburðaríláti og meðhöndlunaríláti) hefur verið framkvæmd og forsendur stikabundinna prófunaraðferða (normleiki, einsleitni) eru uppfylltar er hægt að meta mælanlegar svaranir með t-prófi. Nota má t-prófun fyrir ójafna dreifni (s.s. Welch) eða stikalausa prófun, s.s. Mann-Whitney-U-prófun, ef þessar kröfur eru ekki uppfylltar.

Til að ákvarða umtalsverðan mun milli samanburðaríláta (samanburður og samanburður með leysi eða með dreifiefni) er hægt að prófa ílát samhliða prófunar fyrir hverja samanburðarprófun eins og lýst er fyrir markprófunina. Ef ekki greinist umtalsverður munur í þessum prófunum er hægt að hópa öll ílát með samanburðarprófun og ílát samhliða samanburðarprófana með leysi. Að öðrum kosti skal bera öll meðhöndlunarílát saman við samanburðinn sem er með leysi.

Prófunarskýrsla

Prófunarskýrslan inniheldur eftirfarandi upplýsingar:

Prófunaríðefni:

— eðlisástand og viðeigandi, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, þ.m.t. hreinleiki.

Prófunartegund:

— klónið (hvort arfgerð þess hafi verið greind), birgir eða uppruni (ef þekkt) og skilyrði við ræktun. Ef notuð er önnur tegund en *Daphnia magna* skal greina frá því og rökstyðja það.

Prófunarskilyrði:

— prófunaraðferð sem er notuð (t.d. hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymisprófun, rúmmál, hleðsla sem fjöldi halaflóa á lítra),

— ljóslota og ljósstyrkur,

— tilhögun prófunar (t.d. fjöldi samhliða prófana, fjöldi undaneldisdýra á hverja samhliða prófun),

— upplýsingar um ræktunarmiðilinn sem er notaður,

— ef lífrænu efni er bætt við skal tilgreina samsetningu, uppruna, aðferð við tilreiðslu, heildarmagn lífræns kolefnis/efnafræðilega súrefnisþörf stofnlausna og mat á heildarmagni lífræns kolefnis/efnafræðilegri súrefnisþörf í prófunarmiðlinum sem þar af leiðir,

— ítarlegar upplýsingar um fóðrun, þ.m.t. magn (í mg kolefnis á halafló á dag) og áætlun (t.d. tegund(ir) fóðurs, þ.m.t., ef um er að ræða þörunga, sérheiti (tegund) og stofn ef hann er þekktur, og ræktunarskilyrði),

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal leysi eða dreifiefni og styrk þeirra ef þau eru notuð).

Niðurstöður:

— niðurstöður úr öllum forrannsóknum á stöðugleika prófunaríðefnisins,

— nafnstyrkleikar í prófuninni og niðurstöður úr öllum greiningum til að ákvarða styrk prófunaríðefnisins í prófunarílátunum (sjá dæmi um gagnablöð í 5. viðbæti); einnig skal greina frá endurheimtargetu aðferðarinnar og magngreiningarmörkum,

— gæði vatns í prófunarílátum (þ.e. sýrustig, hitastig og styrkur uppleysts súrefnis, heildarmagn lífræns kolefnis og/eða efnafræðileg súrefnisþörf og harka, eftir atvikum) (sjá dæmi um gagnablað í 4. viðbæti),

— tæmandi skrá yfir lifandi afkvæmi sem hvert undaneldisdýr getur af sér í prófuninni (sjá dæmi um gagnablað í 4. viðbæti),

— fjöldi dauðra undaneldisdýra og dánardagur (sjá dæmi um gagnablað í 4. viðbæti),

— fráviksstuðull fyrir viðkomu samanburðarhóps (byggt á heildarfjölda lifandi afkvæma á hvert undaneldisdýr sem er á lífi í lok prófunar),

— ferill yfir fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr getur af sér í hverri samhliða prófun, að undanskildum öllum undaneldisdýrum sem gætu hafa drepist af slysförum eða fyrir slysni í prófuninni, á móti styrk prófunaríðefnis,

— eins og við á, ferill yfir heildarfjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem lifir af, getur af sér í hverri samhliða prófun á móti styrk prófunaríðefnis,

— eftir því sem við á, minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif á æxlun, þ.m.t. lýsing á þeim tölfræðilegu aðferðum sem eru notaðar og tilgreining á þeirri stærð áhrifanna sem búast mátti við að unnt væri að greina (hægt er að gera styrkgreiningu áður en tilraun hefst til að fá þessar upplýsingar), og styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif á æxlun; upplýsingar um hvaða svarbreytur voru notaðar til að reikna út gildi minnsta styrks sem hefur merkjanleg áhrif og styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif (annað hvort sem heildarfjöldi lifandi afkvæma á hvert undaneldisdýr sem drapst ekki af slysförum eða fyrir slysni í prófuninni eða sem heildarfjöldi lifandi afkvæma á hvert undaneldisdýr sem lifði af), eftir því sem við á skal einnig gera grein fyrir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif eða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif m.t.t. dánartíðni undaneldisdýranna,

— EC_x fyrir æxlun og öryggisbil (t.d. 90 eða 95%) og línurit af aðlagaða líkaninu, sem er notað við þá útreikninga, hallatölu ferils styrkháðrar svörunar og staðalskekkju hans, eftir því sem við á,

— önnur líffræðileg áhrif sem komu fram eða mælingar: greinið frá öllum öðrum líffræðilegum áhrifum, sem komu fram eða voru mæld (t.d. vexti undaneldisdýra) ásamt viðeigandi rökstuðningi,

— útskýring á hvers kyns fráviki frá prófunaraðferðinni.

HEIMILDIR:

1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Í: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Í: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.

13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.'

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR:

Í þessari prófunaraðferð eru notaðar eftirfarandi skilgreiningar:

Dauðsfall af slysförum: dauðsfall, ekki íðefnatengt, af völdum slyss (þ.e. þekkt orsök).

Íðefni: efni eða blanda.

ECx: sá styrkur prófunaríðefnisins, uppleyst í vatni, sem veldur x% samdrætti í æxlun hjá halaflóm á tilgreindum váhrifatíma.

Dauðsfall fyrir slysni: dauðsfall, ekki íðefnatengt, af óþekktum orsökum.

Vaxtarhraði stofns: mælikvarði á stofnvöxt sem samþættir viðkomu og aldursháð dauðsföll (1.–3. heimild). Hjá stofnum í jafnvægi er þetta gildi núll. Fyrir stofna í vexti er gildið jákvætt en neikvætt fyrir minnkandi stofna. Ljóst er að sá síðarnefndi er ekki sjálfbær og deyr að lokum út.

Greiningarmörk: minnsti styrkur sem unnt er að greina en ekki magngreina.

Magngreiningarmörk: minnsti styrkur sem hægt er að magngreina.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): minnsti prófaði styrkur þar sem íðefnið reynist hafa tölfræðilega marktæk áhrif á æxlun og dánarhlutfall undaneldisdýra (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhópinn innan tilgreinds váhrifatímabils. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal þó valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Dánartíðni: dýr er skráð dautt ef það er hreyfingarlaust, þ.e. dýrið getur ekki synt, eða ef útlimir þess hreyfast ekki eða engin hreyfing sést í aftanverðu kviðarholi þess fyrstu 15 sekúndurnar eftir að prófunarílátið er hrist varlega. (Sé önnur skilgreining notuð skal gera grein fyrir henni og vísa til heimildarinnar um hana.)

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC): sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og hefur engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) miðað við samanburðarhópinn innan tilgreinds váhrifatímabils.

Afkvæmi: ungar halaflær sem undaneldisdýrin geta af sér í prófuninni.

Undaneldisdýr: þær kvenkyns halaflær sem eru fyrir hendi í upphafi prófunarinnar og er markmið prófunarinnar að rannsaka viðkomu þeirra.

Viðkoma: fjöldi lifandi afkvæma sem undaneldisdýrin geta af sér á prófunartímabilinu.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

HEIMILDIR

1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

2. viðbætir

TILREIÐSLA FULLSKILGREINDU MIÐLANNA ELENDT M7 OG M4

Aðlögun að miðlunum Elendt M7 og M4

Á sumum rannsóknarstofum hefur reynst erfitt að flytja halaflær beint yfir í miðlana M4 (1. heimild) og M7. Nokkur árangur hefur hins vegar náðst með hægfara aðlögun, þ.e. að flytja halaflærnar úr sínum eigin miðli yfir í 30% Elendt, því næst yfir í 60% Elendt og að lokum yfir í 100% Elendt. Aðlögunartíminn getur þurft að taka allt að einum mánuði.

Tilreiðsla

Snefilefni

Aðskildar stofnlausnir (I) einstakra snefilefna eru fyrst tilreiddar í vatni af viðeigandi hreinleika, t.d. afjónuðu, eimuðu eða þrýstisíuðu yfir himnu. Úr þessum mismunandi stofnlausnum (I) er tilreidd önnur stök stofnlausn (II) sem inniheldur öll snefilefnin (samsett lausn), þ.e.:

Stofnlausn(ir) I (stakt efni)	Magn sem bætt er í vatn	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4)	Til að tilreiða sameinaða stofnlausn II skal bæta eftirfarandi magni af stofnlausn I í vatn	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-faldur	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-faldur	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-faldur	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-faldur	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-faldur	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-faldur	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-faldur	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-faldur	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-faldur	1,0	1,0
$CuCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-faldur	1,0	1,0
KI	65	20 000-faldur	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-faldur	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-faldur	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-faldur	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-faldur	—	—

Lausnirnar Na_2EDTA og $FeSO_4$ eru tilreiddar hvor fyrir sig, þeim hellt saman og þær gufusæfðar þegar í stað. Það gefur:

Fe-EDTA-lausn		1 000-faldur	20,0	5,0

Miðlarnir M4 og M7

Miðlarnir M4 og M7 eru tilreiddir með stofnlausn II, nauðsynlegum frumefnum og vítamínum sem hér segir:

	Magn sem bætt er í vatn	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4)	Magn stofnlausnar sem bætt er við til tilreiðslu miðilsins	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Stofnlausn II (samsett snefilefni)		20-faldur	50	50
Stofnlausnir með helstu næringarefnum (stakt efni)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-faldur	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-faldur	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-faldur	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-faldur	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-faldur	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-faldur	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-faldur	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-faldur	0,1	0,1
Sameinuð vítamínstofnlausn	—	10 000-faldur	0,1	0,1

Samsetta vítamínstofnlausnin er tilreidd með því að bæta vítamínunum þremur í 1 lítra af vatni sem hér segir:

	mg/l			
Þíamínvetnisklóríð	750	10 000-faldur		
Sýanókóbalamín (B_{12})	10	10 000-faldur		
Bíótín	7,5	10 000-faldur		

Samsetta vítamínstofnlausnin er geymd frosin í litlum deiliskömmtum. Vítamínunum er bætt við miðilinn skömmu fyrir notkun.

Ath. Til að koma í veg fyrir að sölt falli út við tilreiðslu sameinaðs miðils skal bæta deiliskömmtum stofnlausnar út í u.þ.b. 500–800 ml af afjónuðu vatni og fylla síðan upp í 1 lítra.

Ath. einnig. Fyrstu birtu upplýsingar um miðilinn M4 voru birtar í Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

———

3. viðbætir

GREINING Á HEILDARMAGNI LÍFRÆNS KOLEFNIS OG GERÐ VENSLARITS FYRIR HEILDARMAGN LÍFRÆNS KOLEFNIS Í ÞÖRUNGAFÓÐRI

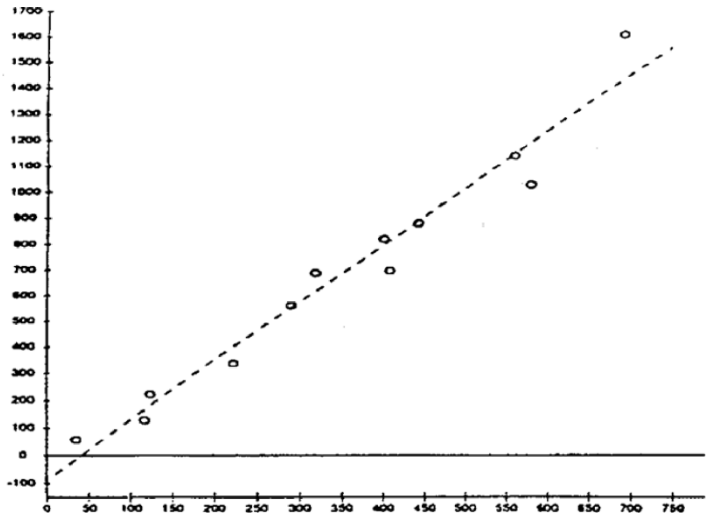
Það skal viðurkennt að kolefnisinnihald þörungafóðurs er yfirleitt ekki mælt beint heldur út frá fylgni (þ.e. venslaritum) með staðgöngumælingum, s.s. fjölda þörungafrumna eða ljósgleypni.

Heildarmagn lífræns kolefnis skal mælt með oxun við háan hita fremur en með aðferðum með útfjólubláu ljósi eða persúlfati. (Sjá ráðleggingar í: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Við gerð venslarits skal skilja þörungana frá vaxtarmiðlinum í skilvindu og síðan er lausnin endurupplyst í eimuðu vatni. Mæla skal staðgöngumæliþáttinn og heildarstyrk lífræns kolefnis í hverju sýni þrisvar. Greina skal núllsýni með eimuðu vatni og leiða heildarstyrk lífræns kolefnis út frá heildarstyrk lífræns kolefnis í þörungasýninu.

Venslarit skulu vera línuleg yfir tilskilið styrksvið kolefnis. Dæmi fylgja hér á eftir.

Ath. Þau ætti ekki að nota fyrir umreikninga; mikilvægt er að rannsóknarstofur útbúi sín eigin venslarit.



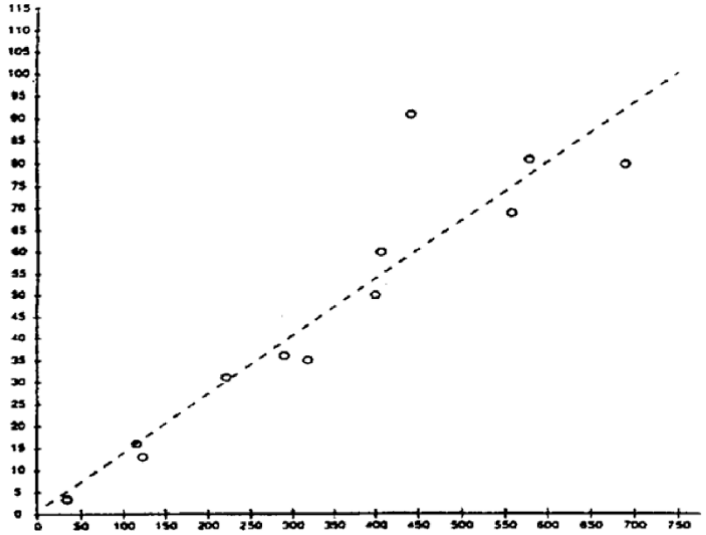
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Aðhvarf af mg/I þurrvigt á mg C/1. Gögn frá óblandaðri sviflausn af hálfsamfelldri loturækt frumna sem er endurupplyst í eimuðu vatni.

x-ás: mg C/1 af óblönduðu þörungafóðri

y-ás: mg/1 þurrvigt af óblönduðu þörungafóðri

Leiðréttingarstuðull – 0,980



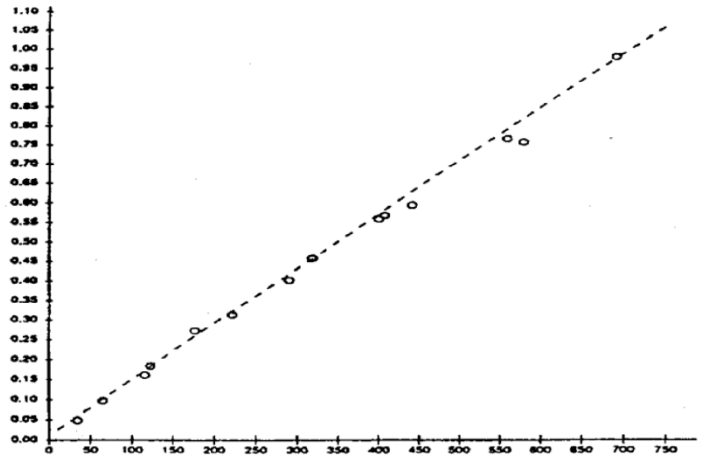
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Aðhvarf af frumufjölda á mg C/1. Gögn frá óblandaðri sviflausn af hálfsamfelldri loturækt frumna sem er enduruppleyst í eimuðu vatni.

x-ás: mg C/1 af óblönduðu þörungafóðri

y-ás: fjöldi frumna/1 af óblönduðu þörungafóðri

Leiðréttingarstuðull – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Aðhvarf af ásogi á mg C/1 (1 cm mælilengd). Gögn frá óblandaðri sviflausn af hálfsamfelldri loturækt frumna sem er enduruppleyst í eimuðu vatni.

x-ás: mg C/1 af óblönduðu þörungafóðri

y-ás: Gleypni við 440 mm í 1/10 þynningarlausn af óblönduðu þörungafóðri

Leiðréttingarstuðull – 0,998

4. viðbætir

DÆMI UM GAGNABLAÐ ÞAR SEM ENDURNÝJUN MIÐILS, EÐLISFRÆÐILEG/EFNAFRÆÐILEG VÖKTUNARGÖGN, FÓÐRUN, FJÖLGUN HALAFLÓA OG DÁNARHLUTFALL UNDANELDISDÝRA ER SKRÁÐ

Tilraun nr.:	Upphafsdagur:			Klón:			Miðill:			Tegund fóðurs:			Prófunarefni:					Nafnstyrkur:	
Dagur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Miðlungs endurnýjun (merkið við)																								
pH (*)																							nýr	
																							gamall	
O_2 (mg/l) (*)																							nýr	
																							gamall	
Hitastig (°C) (*)																							nýr	
																							gamall	
Fóður sem er gefið (merkið við)																								
Fjöldi lifandi afkvæma (**)																								Samtals
Ílát 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Samtals	
Uppsöfnuð afföll hjá undaneldisdýrum (***)																								

(*) Tilgreinið hvaða ílát var notað í tilrauninni

(**) Skráið afkvæmi, sem klöktust ekki út, sem „AB“ í viðeigandi reit

(***) Skráið öll dauðsföll hjá undaneldisdýrum sem „M“ í viðeigandi reit

5. viðbætir

DÆMI UM GAGNABLAÐ TIL AÐ SKRÁ NIÐURSTÖÐUR ÚR EFNAGREININGUM

a) **Mældir styrkleikar**

Nafnstyrkur	Sýni í 1. viku		Sýni í 2. viku		Sýni í 3. viku	
	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt

b) **Mældir styrkleikar sem hundraðshluti af nafnstyrk**

Nafnstyrkur	Sýni í 1. viku		Sýni í 2. viku		Sýni í 3. viku	
	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt

6. viðbætir

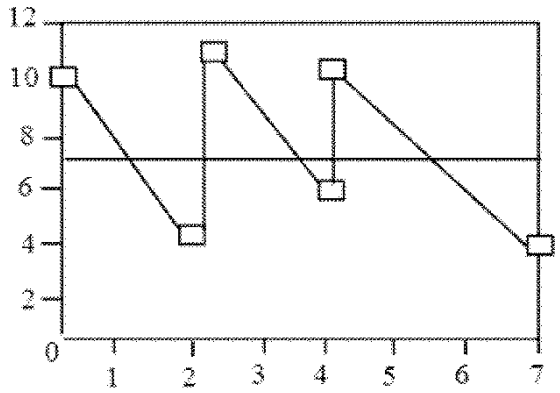
ÚTREIKNINGUR Á TÍMAVEGNU MEÐALTALI

Tímavegið meðaltal

Þar eð styrkur prófunaríðefnis getur minnkað á þeim tíma sem líður milli þess að miðill er endurnýjaður er nauðsynlegt að vega og meta hvaða styrkur skuli valinn sem dæmigerður fyrir þá röð styrkbila sem undaneldisdýr halaflónna komast í snertingu við. Valið skal byggjast á líffræðilegum forsendum sem og tölfræðilegum. Sé t.d. álitið að æxlun verði fyrir mestum áhrifum af toppgildi styrks sem fæst skal nota hámarksstyrk. Sé hins vegar talið að uppsöfnuð áhrif eituríðefnisins eða áhrif þess til lengri tíma séu veigameiri skiptir meðalstyrkurinn meira máli. Í því tilviki er tímaveginn meðalstyrkur sá meðalstyrkur sem viðeigandi er að nota þar eð hann miðast við breytingar á augnabliksstyrk með tímanum.

Mynd 1

Dæmi um tímavegið meðaltal



Á mynd 1 er dæmi um (einfaldaða) prófun sem varir í sjö daga og miðillinn er endurnýjaður á degi 0, 2 og 4.

— Línan, sem sveiflast upp og niður, sýnir styrkinn á hverjum tíma. Gert er ráð fyrir að minnkun styrksins fylgi ferli veldisvísishrörnunar.

— Teiknuðu punktarnir sex eru mældir styrkleikar við upphaf og lok hvers endurnýjunartímabils.

— Breiða, heila línan sýnir stöðu tímavegins meðaltals.

Tímavegið meðaltal er reiknað þannig að svæðið undir tímavegna meðaltalinu er jafnt svæðinu undir styrkferlinum. Útreikningar á framangreindu dæmi eru raktir í töflu 1.

Tafla 1

Útreikningur á tímavegnu meðaltali

Nr. endurnýjunar	Dagar	Styrkur 0	Styrkur 1	Ln(Styrkur 0)	Ln(Styrkur 1)	Svæði
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Nr. endurnýjunar	Dagar	Styrkur 0	Styrkur 1	Ln(Styrkur 0)	Ln(Styrkur 1)	Svæði
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Dagar alls:	7				Heildarsvæði:	50,092
					Tímavegið meðaltal:	7,156

Dagar eru fjöldi daga á endurnýjunartímabilinu

Styrkur 0 er mældur styrkur í upphafi hvers endurnýjunartímabils

Styrkur 1 er mældur styrkur í lok hvers endurnýjunartímabils

Ln (styrkur 0) er náttúrulegur logri styrks 0

Ln (styrkur 1) er náttúrulegur logri styrks 1

*Svæði*er svæðið undir veldisvísisferli hvers endurnýjunartímabils. Það er reiknað á eftirfarandi hátt:

$$\text{Svæði} = \frac{\text{Styrkur } 0 - \text{Styrkur } 1}{Ln(\text{Styrkur } 0) - Ln(\text{Styrkur } 1)} \times \text{Dagur}$$

Tímavegið meðaltal er gildið „Heildarsvæði“ deilt með gildinu „Dagar alls“.

Taflan skal að sjálfsögðu stækkuð svo hún nái yfir 21 dag þegar um er að ræða æxlunarprófun á halaflóm.

Þegar athuganir eru aðeins gerðar í upphafi og lok hvers endurnýjunartímabils er ljóst að ekki er unnt að staðfesta að hrörnunarferlið sé í raun veldisvísisferli. Öðruvísi ferill gæfi annan útreikning á gildinu fyrir „Svæði“. Veldisvísishrörnun er þó ekki ósennileg og er líklega sá ferill sem er best að nota ef aðrar upplýsingar liggja ekki fyrir.

Þó þarf að sýna ítrustu gætni ef ekki tekst með efnagreiningu að finna neitt íðefni í lok endurnýjunartímabilsins. Ómögulegt er að finna raunhæft svæði undir ferlinum nema unnt sé að meta hversu hratt íðefnið hvarf úr lausninni og þar af leiðandi er ógerlegt að fá fram raunhæft, tímavegið meðaltal.

———

7. viðbætir

LEIÐBEININGAR UM SANNGREININGU Á KYNI NÝFÆDDRA

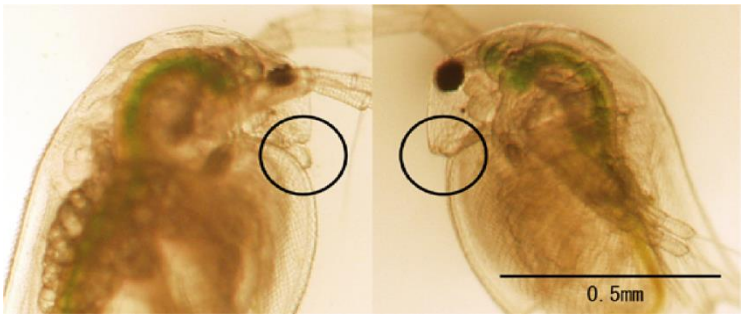
Nýfædd dýr geta orðið að karldýrum við breyttar umhverfisaðstæður, s.s. við styttri ljóslotu, hitabreytingu, minni styrk í fóðri og aukinn þéttleika tegundar (Hobaek og Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Framleiðsla karldýra er einnig þekkt viðbragð við tilteknum skordýravaxtarstýriefnum (Oda *et al*., 2005). Við skilyrði þar sem efnafræðilegir streituvaldar kalla fram fækkun á frjóum afkvæmum eingetinna kvendýra má búast við auknum fjölda karldýra (Efnahags- og framfarastofnunin, 2008). Ekki er mögulegt, á grundvelli fyrirliggjandi upplýsinga, að spá fyrir um hvort heldur kynjahlutfall eða endapunktar æxlunar sýni meira næmi; þó eru vísbendingar um (sjá „fullgildingarskýrsla“, 1. hluti) að þessi fjölgun karldýra sýni minna næmi en fækkun afkvæma. Þar eð megintilgangur prófunaraðferðarinnar er að meta fjölda afkvæma sem verða til er valkvætt að athuga hvort karldýr komi fram. Ef þessi valkvæði endapunktur er metinn í rannsókn skal nota viðbótargildisviðmiðun í prófuninni sem nemur í mesta lagi 5% karldýra í samanburðarrannsóknum.

Hagkvæmasta og auðveldasta leiðin til að greina kyn halaflóa er að nota svipfarseiginleika þeirra því karldýr og kvendýr eru eins erfðafræðilega og kyn þeirra ákvarðast af umhverfinu. Karldýr og kvendýr eru mismunandi að því er varðar lengd og form og byggingu fremsta fálmarans sem er lengri á karldýrum en kvendýrum (mynd 1). Þennan mismun er hægt að sjá strax eftir fæðingu en þó þróast annars stigs kyneinkenni eftir því sem þær stækka (sjá t.d mynd 2 í Olmstead og LeBlanc, 2000).

Flytja skal nýfædd dýr, sem hvert prófunardýr getur af sér, með pípettu í ræktunarskál með prófunarmiðli til að skoða formfræðilegt kyn þeirra. Miðlinum er haldið í lágmarki til að hindra hreyfingar dýranna. Hægt er að skoða fremsta fálmarann með víðsjá (× 10–60).

Mynd 1

24 klst. gamalt karldýr (til vinstri) og kvendýr (til hægri) af tegundinni *D. magna* Hægt er að þekkja karldýr frá kvendýrum af lengd og formi og byggingu fremsta fálmarans eins og sést inni í hringjunum (Tatarazako *et al*., 2004)



HEIMILDIR:

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

———

18) Í stað 66. liðar C-hluta í kafla C.29 komi eftirfarandi:

„66. Prófun telst gild ef:

a) meðalniðurbrot (í %) í ílátum F_C sem innihalda viðmiðunaríðefnið er > 60% á 14. degi ræktunar og

b) meðaltal heildarmagns af ólífrænu kolefni sem er fyrir hendi í samanburðarblönkunum F_B við lok prófunarinnar er < 3mg C/l.

Ef þessi gildi nást ekki skal endurtaka prófunina með sáði frá annarri uppsprettu og/eða endurskoða aðferðirnar sem notaðar eru. Ef t.d. mikil framleiðsla á ólífrænu kolefni í blanksýnum veldur vandkvæðum skal fylgja aðferðinni sem gefin er í 27. til 32. lið.“

19) Í C-hluta bætast eftirfarandi kaflar við:

„C.47 **Eiturhrifaprófun á fiskum á fyrri stigum lífs**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 210 um prófanir (2013). Prófunum á fiskum á fyrri stigum lífs er ætlað að skilgreina banvæn og nær banvæn áhrif íðefna á þau stig og þær tegundir sem prófaðar eru. Þær veita verðmætar upplýsingar fyrir mat á langvinnum banvænum og nær banvænum áhrifum íðefnis á aðrar fisktegundir.

2. Viðmiðunarregla 210 um prófanir grundvallast á tillögu frá Bretlandi sem rætt var á fundi sérfræðinga Efnahags- og framfarastofnunarinnar í Medmenham (Bretlandi) í nóvember 1988 og uppfærð enn frekar á árinu 2013 til að endurspegla reynslu af notkun prófunarinnar og ráðleggingar frá vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar um eiturhrifaprófanir á fiskum sem haldinn var í september 2010 (1. heimild).

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

3. Fiskar á fyrri stigum lífs eru látnir verða fyrir váhrifum af röð styrkleika prófunaríðefnis sem er leyst upp í vatni. Gegnumstreymisskilyrði eru ákjósanlegust; ef það er ekki unnt eru hálfkyrrstöðuskilyrði þó ásættanleg. Að því er varðar nánari upplýsingar skal fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (OECD guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (2. heimild). Prófunin hefst á því að frjóvguð hrogn eru látin í prófunarker og heldur áfram í tegundarbundinn tíma sem samanburðarfiskurinn þarfnast til að ná lífsstigi ungfiska. Banvæn og nær banvæn áhrif eru metin og borin saman við samanburðargildi til að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) í því skyni að ákvarða i. styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) og/eða ii. ECx (t.d. EC10, EC20) með því að nota aðhvarfslíkan til að meta styrkinn sem veldur x% breytingum á mældum áhrifum. Skýrslugjöf um viðeigandi hrifstyrk og breytur getur verið háð regluramma. ECx skal liggja innan styrkleikanna í prófuninni þannig að ECx fáist við innreikning frekar en framreikning (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti).

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

4. Prófunaríðefni vísar til þess sem verið er að prófa. Vatnsleysni (sjá kafla A.6 í þessum viðauka) og gufuþrýstingur (sjá kafla A.4 í þessum viðauka) prófunaríðefnisins skulu vera þekkt og áreiðanleg greiningaraðferð fyrir magngreiningu íðefnisins í prófunarlausnunum, með þekktri og skráðri nákvæmni og þekktum og skráðum magngreiningarmörkum, skal vera fyrir hendi. Niðurstöður úr prófun á bráðum eiturhrifum (sjá kafla C.1 eða C.49 í þessum viðauka), sem á helst að hafa verið gerð á þeirri tegund sem valin var fyrir þessa prófun, geta veitt gagnlegar upplýsingar en þó er ekki nauðsynlegt að framkvæma prófunina.

5. Ef prófunaraðferð er notuð til prófunar á blöndu skal lýsa eiginleikum samsetningar hennar, að því marki sem unnt er, t.d. með efnakenni innihaldsefna hennar, magnbundnu innihaldi og efnasértækum eiginleikum (eins og þeim sem getið er hér að framan). Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu er notuð í eftirlitsskyni skal skoða hvort hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi.

6. Gagnlegar upplýsingar eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki efnis, vatnsleysni, stöðugleiki í vatni og ljósi, pK_a, P_{ow} og niðurstöður úr prófun á auðlífbrjótanleika (t.d. kaflar C.4 eða C.29 í þessum viðauka).

GILDI PRÓFUNARINNAR

7. Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

— styrkur uppleysts súrefnis skal vera > 60% af mettunargildi lofts í allri prófuninni,

— ekki skal muna meira á vatnshitastiginu milli prófunarkerja og frá degi til dags en ± 1,5 °C meðan á prófuninni stendur og skal hitinn vera innan þess hitasviðs sem er tilgreint fyrir prófunartegundina (2. viðbætir),

— greiningarmæling á prófunarstyrkleikum er skyldubundin,

— heildarlifun frjóvgaðra hrogna og árangur eftir klak í samanburðarhópunum og, ef við á, í samanburði með leysi, skal vera meiri en eða jöfn þeim mörkum sem eru skilgreind í 2. viðbæti.

8. Ef minniháttar frávik frá gildisviðmiðunum prófunarinnar koma fram skal athuga afleiðingarnar í tengslum við áreiðanleika prófunargagnanna og þessar athuganir skulu koma fram í skýrslunni. Gera skal grein fyrir og fjalla um áhrif á lifun, klak eða vöxt, sem koma fram í samanburði með leysi, samanborið við neikvæða samanburðinn, í tengslum við áreiðanleika prófunargagna.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Prófunarker

9. Nota má ker úr gleri, ryðfríu stáli eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Þar eð þekkt er að sílíkon hefur mikla getu til að frásoga fitusækin efni skal halda notkun sílíkonröra í gegnumstreymisrannsóknum og notkun sílíkonþétta í snertingu við vatn í lágmarki með því að nota t.d. heilsteypt glerbúr (e. *monoblock glass aquaria*). Kerin skulu vera svo stór að vöxturinn í samanburðarhópunum sé eðlilegur, að styrk uppleysts súrefnis sé viðhaldið (þetta næst t.d. fyrir litlar fisktegundir í 7 lítra keri) og að farið sé að hleðsluhlutfallsviðmiðunum sem gefnar eru í 19. lið. Æskilegt er að prófunarkerunum sé komið fyrir af handahófi á prófunarsvæðinu. Handahófskennd tilhögun með hópa af prófunarkerum, þar sem hver meðhöndlun er fyrir hendi í hverjum hóp, er æskilegri en algerlega handahófskennd tilhögun. Prófunarkerin skulu varin gegn óæskilegri truflun. Prófunarkerfið skal helst undirbúið með styrkleikum prófunaríðefnis í nægilega langan tíma til að sýnt sé fram á stöðugan váhrifastyrk áður en prófunarlífverum er bætt við.

Val á tegund

10. Í töflu 1 eru tilgreindar fisktegundir sem mælt er með. Þetta útilokar þó ekki notkun annarra tegunda en vera má að breyta þurfi prófunaraðferðinni svo að prófunarskilyrði verði við hæfi. Færa skal rök fyrir vali tegundarinnar og tilraunaaðferðarinnar í slíkum tilvikum.

Eldi fisks til undaneldis

11. Nánari upplýsingar um eldi á undaneldisstofni við fullnægjandi skilyrði er að finna í 3. viðbæti og í heimildum sem vísað er í (3.– 5. heimild).

Meðhöndlun frjóvgaðra hrogna, fósturvísa og seiða

12. Í upphafi má láta frjóvguðu hrognin, fósturvísana og seiðin verða fyrir váhrifum í smáum kerum úr gleri eða ryðfríu stáli sem eru með möskva á hliðum eða endum og komið fyrir í meginkerinu þannig að prófunalausnin geti streymt um þau. Framkalla má iðulaust streymi gegnum þessi smáu ker með því að hengja þau upp í arm sem komið er fyrir og hreyfir kerin upp og niður en þannig að lífverurnar eru ávallt í kafi. Koma má frjóvguðum hrognum laxfiska fyrir á grindum eða möskvum með svo stórum opum að seiðin falli niður gegnum þau eftir klak.

13. Ef hrognin hafa verið sett í hrognaker, á grindur eða möskva í meginprófunarílátinu skulu þessir tálmar teknir í burtu eftir klak seiðanna, samkvæmt leiðbeiningum í 3. viðbæti, en möskvunum skal þó haldið til að varna því að seiðin sleppi. Ef nauðsynlegt er að flytja seiðin skal þess gætt að loft leiki ekki um þau og ekki má nota net til að færa seiði úr hrognakerum. Tímasetning þessa flutnings ræðst af tegundinni og skal skráð í skýrsluna. Þó er ekki víst að koma þurfi til flutnings.

Vatn

14. Nota má hvers kyns vatn sem prófunarvatn svo fremi prófunartegundin sýni þar nægilega lifun og vöxt til langs tíma (sjá 4. viðbæti). Gæðin skulu vera stöðug allan prófunartímann. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunaríðefninu) eða skaðleg áhrif á undaneldisstofninn skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mælingar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-},$SO4^{2-}$), ammoníaki, heildarmagni klórvarnarefnaleifa, heildarmagni lífræns kolefnis og svifagna skulu gerðar t.d. tvisvar á ári ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef vitað er að gæði vatnsins eru óstöðug þurfa mælingar að fara fram oftar; tíðnin fer eftir því hversu breytileg gæðin eru. Nokkrir efnafræðilegir eiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 4. viðbæti.

Prófunarlausnir

15. Við gegnumstreymisprófun er nauðsynlegt að nota kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunaríðefninu og þynnir hana (t.d. skammtadælu, hlutfallsþynningarbúnað eða mettunarkerfi) og flytur raðir styrkleika í prófunarkerin. Kanna skal streymi stofnlausna og þynningarvatns reglulega meðan á prófuninni stendur og frávikið skal ekki vera meira en 10% í allri prófuninni. Reynslan sýnir að streymi, sem jafngildir a.m.k. rúmmáli fimm prófunarkera á 24 klukkustundum, er hæfilegt (3. heimild). Ef farið er eftir hleðsluhlutfallinu sem er tilgreint í 19. lið er unnt að fá minna streymi, t.d. sem nemur rúmmáli 2–3 prófunarkera, til að koma í veg fyrir að fóðrið hverfi fljótt.

16. Prófunarlausnir af völdum styrkleikum eru tilreiddar með því að þynna stofnlausn. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- og/eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur (leysnisúlur) eða hlutlaus skömmtunarkerfi (6. heimild) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Ekki er mælt með að nota leysi sem burðarefni. Ef nauðsynlegt er að nota leysi skal þó keyra samanburðarprófun með leysi samhliða, með sama leysisstyrk og í meðhöndlunum með íðefni; þ.e. magn leysis skal helst vera jafnt í öllum styrkleikum sem og í samanburðarprófun með leysi. Að því er varðar sum þynningarkerfi getur þetta verið erfitt tæknilega séð; í því tilviki ætti styrkur leysis í samanburðarprófun með leysi vera jafn og mesti styrkur leysis í meðhöndlunarhópnum. Að því er varðar efni sem erfitt er að gera prófanir á skal fletta upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 23 um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (OECD guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (2. heimild). Ef leysir er notaður ákvarðast valið á honum af efnafræðilegum eiginleikum efnisins. Í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 23 er mælt með hámarksstyrknum 100 µl/l. Til að koma í veg fyrir hugsanleg áhrif leysis á mælda endapunkta (7. heimild) er mælt með því að halda styrk leysis eins lágum og hægt er.

17. Að því er varðar hálfkyrrstöðuprófun er hægt að fylgja tveimur mismunandi aðferðum við endurnýjun. Annað hvort eru nýjar prófunarlausnir tilreiddar í hreinum kerum og lifandi hrogn og seiði flutt varlega í nýju kerin eða prófunarlífverunum haldið í prófunarkerunum en skipt um hluta (a.m.k. tvo þriðju) af prófunarlausninni/rúmmáli í samanburðinum.

VERKFERLI

Váhrifaskilyrði

Tímalengd

18. Prófunin skal hefjast eins fljótt og unnt er eftir að hrognin hafa frjóvgast og helst eiga þau að vera á kafi í prófunarlausnunum áður en klofnun kímblöðrudisksins lýkur, eða eins fljótt og auðið er eftir þetta stig. Lengd prófunar ræðst af þeirri tegund sem er notuð. Nokkur dæmi um æskilega lengd eru tilgreind í 2. viðbæti.

Hleðsla

19. Fjöldi frjóvgaðra hrogna í upphafi prófunarinnar skal vera nægur til að uppfylla tölfræðilegar kröfur. Þau skulu dreifast handahófskennt á meðhöndlunarhópana og nota skal a.m.k. 80 hrogn, sem er dreift jafnt á a.m.k. fjögur ker samhliða prófana, fyrir hvern styrkleika. Hleðsluhlutfallið (lífmassi á rúmmálseiningu prófunarlausnar) skal ekki vera stærra en svo að hægt sé að halda styrk uppleysts súrefnis við a.m.k. 60% af mettunargildi lofts án loftunar á hrogna- og seiðastigi. Í gegnumstreymisprófunum er mælt með því að hleðsluhlutfallið fari ekki yfir 0,5 g/l blautvigtar á 24 klukkustundum og ekki undir neinum kringumstæðum yfir 5 g/l lausnar (3. heimild).

Ljós og hiti

20. Haga skal ljóslotum og vatnshitastigi þannig að henti þeirri tegund sem er prófuð (sjá 2. viðbæti).

Fóðrun

21. Fóður og fóðrun skipta miklu máli og mikilvægt er að rétt fóður fyrir hvert lífsstig sé gefið frá viðeigandi tíma og í magni sem nægir til að styðja eðlilegan vöxt. Fóðrun skal vera nokkuð jöfn í öllum samhliða prófunum, nema það þurfi að aðlaga hana til að taka tillit til dauðsfalla. Fjarlægja skal umframfóður og saur eftir þörfum til að komast hjá uppsöfnun úrgangs. Nákvæmu fóðrunarfyrirkomulagi er lýst í 3. viðbæti en eftir því sem reynsla fæst eru sífellt gerðar endurbætur á fóður- og fóðrunarfyrirkomulagi til að bæta lifun og hámarka vöxt. Lifandi fóður er uppspretta umhverfisfjölbreytni og skal því notað í staðinn fyrir eða til viðbótar við þurrkað eða frosið fóður þegar það hentar tegund og lífsstigi.

Prófunarstyrkleikar

22. Að jafnaði þarf fimm styrkleika prófunaríðefnisins, með a.m.k. fjórar samhliða prófanir fyrir hvern styrk, á styrkbilum með föstum stuðli sem er ekki stærri en 3,2. Þegar styrkleikasvið fyrir prófanir er ákveðið skal taka mið af upplýsingum, ef þær liggja fyrir, um prófanir á bráðum eiturhrifum, helst á sömu tegundum, og/eða um skammtastærðarprófun (1. heimild). Þó skal taka mið af öllum upplýsingum þegar styrkleikasvið fyrir prófanir er ákveðið, þ.m.t. heimildir á borð við t.d. ályktanir út frá byggingarlega hliðstæðum efnum eða gögn úr prófunum á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska. Markprófun, eða framlengd markprófun, með færri en fimm styrkleikum sem endanleg prófun, getur verið ásættanleg þegar eingöngu á að ákvarða styrkleika, sem hafa engin merkjanleg áhrif, byggt á reynslu. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Ekki er nauðsynlegt að prófa prófunaríðefni við styrkleika sem er meiri en sem nemur 96 klukkustunda LC_{50} eða 10 mg/l, eftir því hvor er minni.

Samanburðir

23. Keyra skal samanburðarprófun með þynningarvatni og, ef þörf er á, samanburðarprófun með leysi, sem inniheldur einungis leysi sem burðarefni, til viðbótar við styrkleikaraðir prófunaríðefnisins (sjá 16. lið).

Tíðni magngreininga og mælinga

24. Áður en váhrifatímabilið hefst skal tryggja að íðefnagjafabúnaður í öllum samhliða prófunum starfi rétt (til dæmis með því að mæla prófunarstyrkleikana). Allar greiningaraðferðir sem þörf er á skulu staðfestar, þ.m.t. viðeigandi magngreiningarmörk og fullnægjandi þekking á stöðugleika efnisins í prófunarkerfinu. Meðan á prófuninni stendur er styrkur prófunaríðefnisins ákvarðaður með reglulegu millibili til að lýsa váhrifunum. Þörf er á a.m.k. fimm ákvörðunum. Í gegnumstreymiskerfum skal gera greiningarmælingar á prófunaríðefninu í einni samhliða prófun fyrir hvern styrk a.m.k. vikulega og skipta kerfisbundið milli samhliða prófana. Fleiri magngreiningar auka oft gæði prófunarniðurstaðna. Það gæti þurft að sía sýni til að fjarlægja allar efnisagnir (t.d. með síu með opstærðinni 0,45 μm) eða skilja þau í skilvindu til að tryggja að ákvarðanir séu gerðar á íðefninu í eiginlegu lausninni. Til að draga úr ásogi prófunaríðefnisins skulu síur mettaðar fyrir notkun. Ef mældir styrkleikar haldast ekki innan við 80–120% af nafnstyrk skal hrifstyrkur ákvarðaður og gefinn upp miðað við meðaltal styrks fyrir gegnumstreymisprófanir (sjá útreikning á meðaltali í 6. viðbæti við prófunaraðferð C.20 (8. heimild)) og gefinn upp miðað við faldmeðaltal mælds styrks fyrir hálfkyrrstöðuprófanir (sjá 5. kafla í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (OECD guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (2. heimild)).

25. Meðan á prófuninni stendur skal mæla uppleyst súrefni, sýrustig og hitastig í öllum prófunarkerum a.m.k. einu sinni í viku og seltu og hörku, ef þurfa þykir, við upphaf og lok prófunarinnar. Helst skal vakta hitastigið stöðugt í a.m.k. einu prófunarkeri.

Athuganir

26. **Fósturvísisþroskunarstig**: fósturvísisstig skal sannreynt eins nákvæmlega og unnt er við upphaf váhrifa frá prófunaríðefninu. Þetta er hægt að gera með því að nota dæmigert úrtak hrogna sem hafa verið varðveitt á viðeigandi hátt og hreinsuð.

27. **Klak og lifun:** athuganir á klaki og lifun skulu gerðar a.m.k. daglega og fjöldinn skráður. Ef sveppur finnst á hrognum snemma í fósturvísisþroskun (t.d. á fyrsta eða öðrum degi prófunar) skal telja og fjarlægja þau hrogn. Fjarlægja skal dauða fósturvísa, seiði og ungfisk um leið og eftir þeim er tekið þar eð þau geta sundrast hratt og hlutast í sundur vegna atferlis annarra fiska. Ítrustu varúðar skal gætt þegar dauð dýr eru fjarlægð til að skaða ekki nálæg hrogn eða seiði. Merki um dauða eru mismunandi eftir tegund og lífsstigi. Til dæmis:

— frjóvguð hrogn: greinileg minnkun á gagnsæi og litarbreyting, einkum á fyrstu stigum, sem orsakast af kekkjun og/eða útfellingu prótína og veldur því að þau verða hvít og ógagnsæ,

— fósturvísar, seiði og ungfiskur: hreyfingarleysi og/eða engar öndunarhreyfingar og/eða enginn hjartsláttur og/eða engin viðbrögð við líkamlegu áreiti.

28. **Afbrigðilegt útlit:** skrá skal fjölda seiða eða ungfiska með afbrigðilega skrokkgerð með hæfilegu millibili, sem ræðst af lengd prófunar og eðli þess afbrigðileika sem er lýst. Hafa skal í huga að afbrigðileg seiði og ungfiskar koma fyrir í náttúrunni og geta verið allmargir hundraðshlutar í samanburðarhópi eða hópum hjá sumum tegundum. Þegar vansköpun og óeðlilegt atferli henni tengt eru talin það alvarleg að þau valda lífverunni talsverðri þjáningu og hún er það langt leidd að hún nær ekki bata má fjarlægja hana úr prófuninni. Slík dýr skal aflífa og meðhöndla sem dauðsföll í síðari gagnagreiningu. Eðlileg fósturvísisþroskun hefur verið skráð fyrir flestar tegundir sem mælt er með í þessari prófunaraðferð (9.–12. heimild).

29. **Óeðlilegt atferli:** afbrigðileiki, t.d. oföndun, ósamstillt sund, ódæmigerð ró og óeðlilegt atferli við fóðurát, skal skráður með hæfilegu millibili sem ræðst af lengd prófunarinnar (t.d. einu sinni á dag fyrir hlýsjávartegundir). Þótt erfitt sé að meta umfang þessara áhrifa geta þau, þegar þau koma í ljós, auðveldað túlkun á gögnum um dánartíðni.

30. **Vigtun:** við lok prófunar skulu allir lifandi fiskar vegnir a.m.k. í hverri samhliða prófun (gera skal grein fyrir fjölda fiska í samhliða prófun og meðalþyngd hvers dýrs): helst sem blautvigt — (þerraðir með pappír), þó má einnig skrá þurrvigtargögn (13. heimild).

31. **Lengd:** við lok prófunar er lengd hvers dýrs mæld. Mælt er með heildarlengd en hægt er að nota staðallengd ef sporðuggarots eða uggaeyðingar gætir. Nota skal sömu aðferð fyrir alla fiska í tiltekinni prófun. Mæla má lengd hvers dýrs t.d. með rennimáli, stafrænni myndavél eða míkrómæli í kvörðuðu augngleri. Dæmigerðar lágmarkslengdir eru skilgreindar í 2. viðbæti.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

32. Mælt er með að tilhögun tilraunar og val á tölfræðilegri prófun veiti nægilegan styrk (80% eða meira) til að greina breytingar á endapunktum sem hafa líffræðilega þýðingu ef gera skal grein fyrir styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Skýrslugjöf um viðeigandi hrifstyrk og breytur getur verið háð regluramma. Ef gera á grein fyrir EC_x skulu tilhögun tilraunar og val á aðhvarfslíkani gera það kleift að meta EC_x þannig að i. 95% öryggisbilið sem gefið er upp fyrir EC_x innihaldi ekki núll og sé ekki of vítt, ii. 95% öryggisbilið fyrir spáða meðaltalið við EC_x innihaldi ekki meðaltal samanburðarins og iii. ekki sé marktækur skortur á samræmi milli aðhvarfslíkansins og gagnanna. Báðar aðferðir útheimta tilgreiningu á því hundraðshlutfalli breytinga á hverjum endapunkti sem mikilvægt er að greina eða áætla. Tilhögun tilraunar skal sniðin þannig að slíkt sé unnt. Ef ofangreind skilyrði til að ákvarða EC_x eru ekki uppfyllt skal nota aðferðina til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Ekki er líklegt að sama breyting á hundraðshlutfalli eigi við um alla endapunkta né heldur er líklegt að unnt sé að hanna framkvæmanlega tilraun sem uppfyllir þessar viðmiðanir fyrir alla endapunkta og því er brýnt, þegar tilraunin er hönnuð, að leggja áherslu á endapunkta sem skipta máli fyrir viðkomandi tilraun. Tölfræðileg flæðirit og leiðbeiningar fyrir hverja aðferð er að finna í 5. og 6. viðbæti til að leiðbeina við meðferð gagna og við val á heppilegustu tölfræðilegu prófuninni eða líkaninu til að nota. Nota má aðrar tölfræðilegar aðferðir, að því tilskildu að þær séu vísindalega rökstuddar.

33. Nauðsynlegt er að greina breytileika innan hverrar samstæðu samhliða prófana með dreifnigreiningu eða aðferð með tengslatöflum og nota viðeigandi aðferðir til tölfræðilegra greininga á grundvelli þessarar greiningar. Til að gera margfaldan samanburð milli niðurstaðna fyrir hvern styrk og fyrir samanburðina er mælt með Jonckheere-Terpstra-prófun með stiglækkun eða Williams-prófun fyrir stöðuga svörun og Cochran-Armitage-prófun með stiglækkun fyrir skammtabundna svörun sem er í samræmi við einhalla styrkháða svörun og án vísbendinga um aukalegan tvíliðubreytileika (14. heimild). Ef vísbendingar eru um aukalegan tvíliðubreytileika er mælt með breytingu Rao-Scott á Cochran-Armitage-prófuninni (15. og 16. heimild) eða Williams- eða Dunnett-prófun (eftir arkarsínus af kvaðratrótinni (arcsin-sqrt-umbreytingu)) eða Jonckheere-Terpstra-prófun, sem er notuð á hluta samhliða prófana. Ef gögn eru ekki í samræmi við einhalla styrkháða svörun getur Dunnett- eða Dunn- eða Mann-Whitney-aðferðin verið gagnleg fyrir samfellda svörun og nákvæmniprófun Fishers fyrir skammtabundna svörun (14., 17. og 18. heimild). Þess skal gætt við notkun á hvaða tölfræðiaðferð eða líkani sem er að kröfurnar í aðferðinni eða líkaninu séu uppfylltar (t.d. breytileiki milli kera er áætlaður og gert ráð fyrir honum í tilhögun tilraunar og í prófuninni eða líkaninu sem er notað). Gögn skulu metin m.t.t. normleika og í 5. viðbæti er tilgreint hvað skal gera við leifar úr dreifnigreiningu. Í 6. viðbæti er fjallað um viðbótarathuganir varðandi aðhvarfsaðferðina. Taka skal til athugunar umbreytingar til að uppfylla kröfur í tölfræðilegu prófi. Umbreytingar, sem gera það kleift að aðlaga aðhvarfslíkan útheimta þó sérstaka varkárni þar eð t.d. 25% breyting á óumbreyttri svörun samsvarar ekki 25% breytingu á umbreyttri svörun. Í öllum greiningum er prófunarkerið, ekki hver fiskur fyrir sig, greiningareiningin og tilraunaeiningin og bæði tilgátuprófanir og aðhvarf skulu endurspegla það (3., 14., 19. og 20. heimild).

Prófunarskýrsla

34. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni:

Efni með einum efnisþætti

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv., (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis, ef við á).

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er, t.d. með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Prófunartegund:

— vísindaheiti, stofn, uppruni frjóvguðu hrognanna og aðferð við að afla þeirra og meðhöndlun eftir það.

Prófunarskilyrði:

— prófunaraðferðin sem er notuð (t.d. hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymi, hleðsla),

— ljóslota eða ljóslotur,

— tilhögun prófunar, (t.d. fjöldi prófunarkera og kera samhliða prófana, fjöldi hrogna á hvert ker samhliða prófana, efni og stærð prófunarkers (hæð, breidd, rúmmál), vatnsmagn í hverju prófunarkeri),

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal uppleysandi efnið og styrk þess ef það er notað),

— aðferð við skömmtun prófunaríðefnis (t.d. dælur, þynningarkerfi)

— endurheimtunargeta aðferðarinnar og nafnstyrkleikar í prófuninni, magngreiningarmörk, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarkerjunum og sú aðferð, sem er notuð til að fá þessi gildi, og gögn sem sýna að mælingarnar vísi til styrkleika prófunaríðefnisins í eiginlegu lausninni,

— eiginleikar þynningarvatnsins: sýrustig, harka, hiti, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn lífræns kolefnis (ef það er mælt), svifagnir (ef þær eru mældar), selta prófunarmiðilsins (ef hún er mæld) og allar aðrar mælingar sem gerðar eru,

— gæði vatns í prófunarílátum, sýrustig, harka, hiti og styrkur uppleysts súrefnis,

— nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund eða tegundir fóðurs, uppruna fóðurs, magn, sem er gefið, og hve oft er gefið).

Gerð er grein fyrir niðurstöðum sérstaklega (eða fyrir hverja samhliða prófun) og sem meðaltali og frávikstuðli, eins og við á, fyrir eftirfarandi endapunkta:

— sönnun fyrir því að heildarlifun í samanburðarhópunum uppfylli staðalinn fyrir prófunartegundina (2. viðbætir),

— gögn um dánartíðni á hverju stigi (fósturvísis-, seiða- og ungfiska-) og uppsöfnuð afföll,

— fjöldi daga fram að klaki, fjöldi seiða sem klekjast hvern dag og lok klaks,

— fjöldi heilbrigðra fiska í lok prófunar,

— gögn um lengd (tilgreinið annað hvort staðal- eða heildarlengd) og þyngd eftirlifandi dýra,

— hlutfall formfræðilegs afbrigðileika, lýsing á honum og fjöldi, ef um slíkt er að ræða,

— hlutfall tilvika þar sem atferlistengd áhrif koma fram, lýsing á þeim og fjöldi, ef um slíkt er að ræða,

— aðferð við tölfræðilega greiningu (aðhvarfsgreining eða dreifnigreining) og meðhöndlun gagna (tölfræðileg prófun eða líkan sem er notað),

— styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif fyrir hverja svörun sem metin er,

— minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (við p=0,05) fyrir hverja svörun sem metin er,

— EC_x fyrir hverja svörun sem metin er, ef við á, og öryggisbil (t.d. 90% eða 95%) og línurit aðlagaða líkansins sem er notað við útreikningana, ferli styrkháðrar svörunar, formúla aðhvarfslíkans, áætlaðar líkanbreytur og staðalskekkjur þeirra.

Öll frávik frá prófunaraðferðinni.

Umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif frávika frá prófunaraðferð á niðurstöðu prófunar.

Tafla 1

Ráðlagðar prófunarfisktegundir

FERSKVATN	ÁRÓSAVATN OG SJÓR
Oncorhynchus mykiss Regnbogasilungur	*Cyprinodon variegatus* Kjammkerplingur
Pimephales promelas Breiðkollur	*Menidia* sp. Gljáæringi
Danio rerio Sebradanni	
Oryzias latipes Japanskur rískarpi eða Medaka	

HEIMILDIR:

1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

8) Kafli C.20 í þessum viðauka, Æxlunarprófun á *Daphnia magna*

9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 - 376.

14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR:

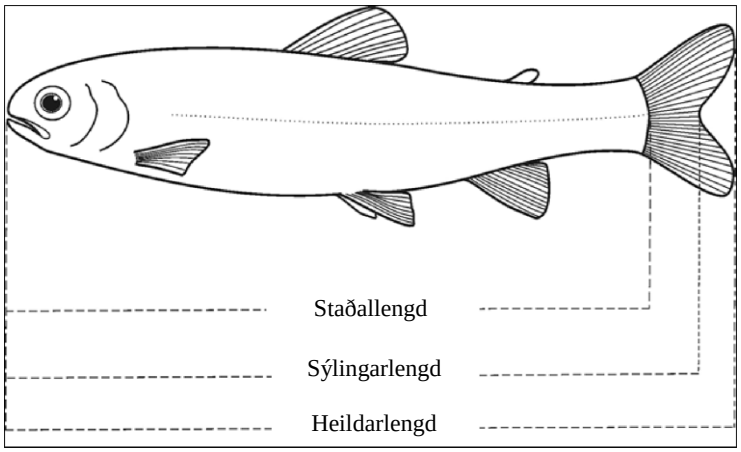
Sýlingarlengd: lengd frá fremsta enda trjónu að enda miðuggageislanna í sporðinum og er notuð fyrir fiska þar sem erfitt er að sjá hvar hryggjarsúlan endar (www.fishbase.org)

Staðallengd: lengd fisks sem er mæld frá fremsta enda trjónu að aftari enda síðasta hryggjarliðar eða aftari enda miðhluta sporðplötunnar. Í stuttu máli er lengd sporðuggans ekki tekin með í þessari mælingu. (www.fishbase.org)

Heildarlengd: lengd frá fremsta enda trjónu að fremsta enda lengri blöðkuhelmings sporðuggans, við mælingu eru blöðkuhelmingarnir lagðir þétt saman um miðlínuna. Mælt er í beinni línu, ekki eftir sveigju skrokks (www.fishbase.org)

Mynd 1

Lýsing á mismunandi lengdum sem notaðar eru



Íðefni: efni eða blanda

EC_x: (Hrifstyrkur sem hefur x% áhrif) er sá styrkur sem hefur x% áhrif á prófunarlífverur innan tiltekins váhrifatímabils í samanburði við samanburðarprófun. Til dæmis er EC_{50} sá styrkur sem metið er að hafi, við prófunarendapunkt, áhrif á 50% af þýði sem er látið verða fyrir váhrifum yfir tilgreint váhrifatímabil.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): minnsti styrkur prófunaríðefnis þar sem efnið reynist hafa tölfræðilega marktæk áhrif (við $p < 0,05$) miðað við samanburðinn. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal þó að valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif). Leiðbeiningar eru settar fram í 5. og 6. viðbæti.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC): sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og hefur engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) miðað við samanburðinn innan tilgreinds váhrifatímabils.

Prófunaríðefni: sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

IUPAC: Alþjóðasamtök um hreina og hagnýta efnafræði.

SMILES: SMILES-kerfið.

2. viðbætir

PRÓFUNARSKILYRÐI, TÍMALENGD OG VIÐMIÐANIR FYRIR LIFUN ÞEIRRAR TEGUNDAR SEM MÆLT ER MEÐ

TEGUND	PRÓFUNARSKILYRÐI			TÍMALENGD PRÓFUNAR SEM MÆLT ER MEÐ	Dæmigert meðaltal lágmarksheildar-lengdar samanburðarfiska við lok rannsóknar (mm) ([1])	LIFUN Í SAMANBURÐARHÓPUM (lágmark)	
	Hitastig (°C)	Selta ($^0/_{00}$)	Ljóslota (klst.)			Árangur í klaki	Árangur eftir klak
Ferskvatn:							
Oncorhynchus mykiss Regnbogasilungur	10 ± 1,5 ([2])		12–16 ([3])	2 vikur eftir að samanburðarhópar taka sjálfir inn fæðu (eða 60 dögum eftir klak)	40	75%	75%
Pimephales promelas Breiðkollur	25 ± 1,5		16	32 dagar frá upphafi prófunar (eða 28 dagar eftir klak)	18	70%	75%
Danio rerio Sebradanni	26 ± 1,5		12–16 ([4])	30 dagar eftir klak	11	70%	75%
Oryzias latipes Japanskur rískarpi eða Medaka	25 ± 2		12–16([4])	30 dagar eftir klak	17	80%	80%
Árósavatn og sjór:							
Cyprinodon variegatus Kjammkerplingur	25 ± 1,5	15–35 ([5])	12–16 ([4])	32 dagar frá upphafi prófunar (eða 28 dagar eftir klak)	17	75%	80%
***Menidia* sp.** Gljáæringi	22–25	15–35 ([5])	13	28 dagar	20	80%	60%

Skýringar:

([1]) Dæmigert meðaltal lágmarksheildarlengdar er ekki gildisviðmiðun en frávik, sem liggja undir þeirri tölu sem tilgreind er, skulu athuguð vandlega í tengslum við næmi prófunar. Meðaltal lágmarksheildarlengdar fæst úr völdum gögnum sem liggja fyrir á þessum tímapunkti.

([2]) Það getur reynst nauðsynlegt að nota annað hitastig fyrir tiltekinn stofn regnbogasilungs sem prófaður er. Undaneldisstofninn skal haldinn við sama hitastig og það sem á að nota fyrir hrognin. Eftir móttöku hrogna frá atvinnuræktanda er nauðsynlegt að laga hitastigið að prófunarhitastigi í stuttan tíma (t.d. í 1–2 klst.) eftir komu.

([3]) Myrkur hjá seiðum þar til einni viku eftir klak, nema þegar verið er að skoða þau, síðan dauf lýsing í allri prófuninni (12–16 klukkustunda ljóslota) ([4]).

([4]) Birtufyrirkomulagið skal vera stöðugt við öll prófunarskilyrði.

([5]) Þetta skal framkvæmt með ± $2^0/_{00}$ nákvæmni í öllum prófunum.

3. viðbætir

LEIÐBEININGAR UM FÓÐRUN OG MEÐHÖNDLUN UNDANELDIS- OG TILRAUNADÝRA AF TEGUNDUM SEM MÆLT ER MEÐ

TEGUND	FÓÐUR (*)				TILFÆRSLUTÍMI EFTIR KLAK	TÍMI AÐ FYRSTU FÓÐRUN
	Fiskur til undaneldis	Nýklakin seiði	Ungfiskar			
			Gerð	Tíðni		
Ferskvatn:						
Oncorhynchus mykiss Regnbogasilungur	silungafóður	ekkert ([a])	Startfóður fyrir silung BSN	2–4 fóðranir á dag	14–16 dögum eftir klak eða þegar seiðin synda upp (ekki nauðsynlegt)	19 dögum eftir klak eða þegar seiðin synda upp
Pimephales promelas Breiðkollur	BSN, fóður í flögum, FBS	BSN	BSN48, fóður í flögum	2–3 á dag	um leið og klak hefur náð 90%	2 dögum eftir klak
Danio rerio Sebradanni	BSN, fóður í flögum	Seiðafóður af almennum markaði, frumdýr ([b]), prótín ([c])	BSN48, fóður í flögum,	BSN einu sinni á dag, fóður í flögum tvisvar á dag	um leið og klak hefur náð 90%	2 dögum eftir klak
Oryzias latipes Japanskur rískarpi eða Medaka	fóður í flögum	BSN, fóður í flögum (eða frumdýr eða hjóldýr)	BSN48, fóður í flögum (eða hjóldýr)	BSN einu sinni á dag, fóður í flögum tvisvar á dag eða fóður í flögum og hjóldýr einu sinni á dag	á ekki við	6–7 dögum eftir hryggningu
Árósavatn og sjór:						
Cyprinodon varieqatus Kjammkerplingur	BSN, fóður í flögum, FBS	BSN	BSN48	2-3 fóðranir á dag	á ekki við	1 degi eftir klak/eftir að seiði synda upp
***Menidia* sp.** Gljáæringi	BSN48, fóður í flögum	BSN	BSN48	2-3 fóðranir á dag	á ekki við	1 degi eftir klak/eftir að seiði synda upp

Skýringar:

(*) Fóður skal gefið að saðningu. Fjarlægja skal umframfóður og saur eftir þörfum til að komast hjá uppsöfnun úrgangs.

FBS frosnar saltvatnsrækjur, fullvaxta *Artemia* sp.

BSN Saltvatnsrækjur, nýklaktar

BSN48 Saltvatnsrækjur, 48 klst. gamlar

([a]) kviðpokaseiði þurfa ekkert fóður

([b]) síuð úr blandaðri ræktun

([c]) kyrni úr gerjunarferli.

4. viðbætir

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efnisþáttur	Styrkmörk
Efnisagnir	5 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	2 mg/l
Ójónað ammoníak	1 µg/l
Klórleifar	10 µg/l
Heildarmagn fosfórlífrænna varnarefna	50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	25 ng/l
Ál	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kóbalt	1 µg/l
Kopar	1 µg/l
Járn	1 µg/l
Blý	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Sink	1 µg/l
Kadmíum	100 ng/l
Kvikasilfur	100 ng/l
Silfur	100 ng/l

5. viðbætir

TÖLFRÆÐILEGAR LEIÐBEININGAR TIL AÐ ÁKVARÐA STYRK SEM HEFUR ENGIN MERKJANLEG ÁHRIF

Almennt

Greiningareiningin er samhliða prófunarkerið. Í samfelldum mælingum, s.s. stærð, skal því reikna meðaltal eða miðgildi samhliða prófunarinnar og þessi gildi úr samhliða prófuninni eru greiningargögnin. Sýna skal fram á styrk prófananna sem notaðar eru, helst á grundvelli fullnægjandi rannsóknarsögulegs gagnagrunns fyrir hverja rannsóknarstofu. Stærðaráhrifin, sem hægt er að greina með 75–80% styrk, skulu gefin upp fyrir hvern endapunkt ásamt tölfræðilegu prófuninni sem á að nota.

Í gagnagrunnunum, sem voru aðgengilegir þegar þessi prófunaraðferð var þróuð, er fastsettur sá styrkur sem er mögulegur með þeim tölfræðiaðferðum sem mælt er með. Hver rannsóknarstofa skal sýna fram á hæfni sína til að uppfylla þessa kröfu um styrk, annaðhvort með því að framkvæma sína eigin styrkgreiningu eða með því að sýna fram á að fráviksstuðullinn fyrir hverja svörun fari ekki yfir 90. hundraðshlutamarkið í fráviksstuðlunum sem eru notaðir við þróun viðmiðunarreglnanna um prófanir. Þessir frávikstuðlar eru tilgreindir í töflu 1. Ef eingöngu meðaltöl eða miðgildi samhliða prófana liggja fyrir má líta framhjá innan samhliða prófunar-frávikstuðlinum.

Tafla 1

Frávikstuðlar í 90. hundraðshlutamarki fyrir valdar ferskvatnstegundir

Tegund	Svörun	Frávikstuðull_milli samhliða prófana	Frávikstuðull_innan samhliða prófana
Regnbogasilungur	Lengd	17,4	9,8
	Þyngd	10,1	28
Breiðkollur	Lengd	16,9	13,5
	Þyngd	11,7	38,7
Sebradanni	Lengd	43,7	11,7
	Þyngd	11,9	32,8

Í nánast öllum tölfræðilegum prófunum, sem eru notaðar til að meta eiturefnafræðilegar rannsóknir á rannsóknarstofu, er það samanburðurinn milli meðhöndlunarhópa og samanburðarhópa sem skiptir máli. Af þessum sökum á ekki við að gera kröfu um marktækt F-próf dreifnigreiningar áður en Dunnett- eða Williams-prófun er notuð, eða marktækt Kruskal-Wallis-próf áður en Jonkheere-Terpstra-, Mann-Whitney- eða Dunn-prófun er notuð, (Hochberg og Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnett-prófun er með innbyggða aðlögun vegna margfalds samanburðar og notkun F-prófs sem dyravarðar (e. *gatekeeper*) hefur óhagstæð áhrif á hlutfall falsjákvæðra og falsneikvæðra niðurstaðna í henni. Að sama skapi viðhalda Williams- prófun með stiglækkun og Jonckheere-Terpstra-prófanir, með marktækni sem nemur 0,05 á hverju stigi, 5% heildarhlutfalli falsjákvæðra niðurstaðna og notkun F- eða Kruskal-Wallis-prófunar sem dyravarðar hefur neikvæð áhrif á þetta hlutfall og styrk prófananna. Aðlaga þarf Mann-Whitney- og Dunn-prófunina vegna margfalds samanburðar og mælt er með Bonferroni-Holm-aðlöguninni.

Ítarleg umfjöllun um flestar ráðleggingarnar varðandi tilgátuprófanir og sannprófun forsenda, sem liggja þessum prófunum til grundvallar, er að finna í skjali Efnahags- og framfarastofnunar (2006) sem inniheldur einnig ítarlega heimildaskrá.

Meðhöndlun samanburða þegar leysir er notaður

Ef leysir er notaður skulu samanburðarprófun með þynningarvatni og samanburðarprófun með leysi einnig teknar með. Bera skal samanburðina tvo saman m.t.t. hverrar svörunar og sameina þá til tölfræðilegrar greiningar ef ekki finnst marktækur munur milli samanburðanna. Annars skal nota samanburðinn með leysi til að ákvarða styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif eða fyrir mat á EC_x og samanburðurinn með vatni er ekki notaður. Sjá takmörkun í gildisviðmiðunum (7. liður)

Nota skal T-próf eða Mann-Whitney-prófun til að bera saman samanburðinn með þynningarvatni og samanburðinn með leysi við marktækni sem nemur 0,05 fyrir lengd, þyngd, hlutfall klakinna hrogna eða dauðra eða afbrigðilegra seiða og fyrir fyrsta og síðasta dag klaks eða þegar seiðin synda upp og meðhöndlunarhóparnir hunsaðir. Gera skal grein fyrir niðurstöðum úr þessum prófunum.

Stærðarmælingar (lengd og þyngd)

Mælingar á lengd og þyngd hvers fisks fyrir sig geta verið normaldreifðar eða log-normaldreifðar. Í báðum tilvikum hafa meðalgildi samhliða prófana tilhneigingu til að vera normaldreifð samkvæmt meginmarkgildissetningu tölfræðinnar og staðfest með gögnum úr yfir hundrað ELS-rannsóknum á fyrsta lífsstigi þriggja ferskvatnstegunda. Ef gögn eða rannsóknarsögulegir gagnagrunnar gefa til kynna log-normaldreifingu stærðargilda fyrir hvern fisk fyrir sig er að öðrum kosti hægt að reikna meðaltal logra samhliða prófana fyrir gildi hvers fisks fyrir sig og þá geta gögn til greiningar verið andlograr þessa meðaltals logra samhliða prófana.

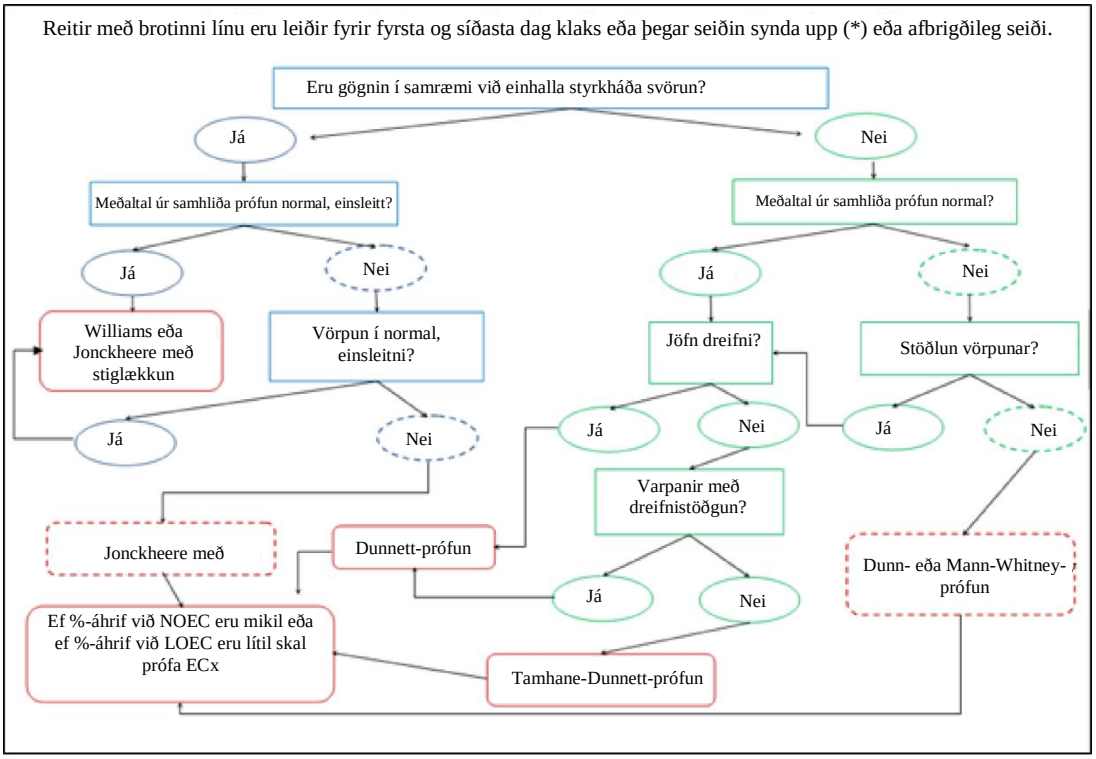
Meta skal gögn með tilliti til samræmis við normaldreifingu og einsleitni dreifni. Í þessu skyni skal nota leifar úr dreifnigreiningarlíkani með styrk sem eina skýringarbreytuflokkinn. Nota má punktarit og súlurit eða laufrit (e. *stem-and-leaf plot*) til sjónrænnar ákvörðunar. Að öðrum kosti er hægt að nota formlega prófun, s.s. Shapiro-Wilk- eða Anderson-Darling-prófun. Hægt er að meta samræmi við einsleitni dreifni út frá sjónrænni skoðun á sama punktariti eða formlega út frá Levenes-prófun. Eingöngu þarf að meta stikabundin próf (t.d. Williams, Dunnett) með tilliti til normleika eða einsleitni dreifni.

Gefa skal gaum að hugsanlegum einförum og áhrifum þeirra á greininguna. Hægt er að nota einfaraprófun Tukeys og sjónræna skoðun á sömu ferlum fyrir leifar og lýst er hér að framan. Rétt er að minna á að samhliða prófanir eru athugaðar í heild sinni og því skal einfara einungis sleppt úr greiningu að vel athuguðu máli.

Tölfræðilegar prófanir, þar sem eiginleikar tilraunatilhögunarinnar og líffræðilegar væntingar eru nýtt, eru leitniprófanir með stiglækkun s.s. Williams og Jonckheere-Terpstra. Í þessum prófunum er gengið út frá einhalla styrkháðri svörun og meta skal gögn m.t.t. samræmis við þá forsendu. Þetta er hægt að gera sjónrænt út frá punktariti af meðaltali samhliða prófana á móti prófunarstyrk. Gagnlegt er að leggja skiptan línulegan feril (e. *piecewise linear plot*) sem tengir saman meðaltal styrks, vegið með stærð samhliða sýnis, yfir þetta punktarit. Mikil frávik frá einhalla í þessum skipta, línulega ferli bendir til þess að hugsanlega þurfi að nota óleitniprófanir. Að öðrum kosti er hægt að nota formlegar prófanir. Einföld formleg prófun felst í því að reikna línulegt og annars stigs samanburðarfall styrkmeðaltals. Ef annars stigs samanburðarfallið er marktækt en línulega samanburðarfallið ómarktækt er það vísbending um hugsanlegt vandamál með einhalla sem skal þá meta frekar út frá línuritum. Ef normleiki eða einsleitni dreifni er til vandræða er hægt að leiða þessi samanburðarföll út frá gögnum úr röðunarvörpun. Nota má aðrar aðferðir, s.s. Bartholomew-prófun fyrir einhalla, en það hefur flækjur í för með sér.

Mynd 2

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) – flæðirit yfir stærðarmælingar (lengd og þyngd)



(*) Þessar svaranir uppfylla aldrei forsendur fyrir stikabundna greiningu eða líkön.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er ákvarðaður með notkun á Williams-prófun með stiglækkun eða Jonckheere-Terpstra-prófun, nema gögnin séu ekki í samræmi við kröfur varðandi þessar prófanir. Í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (2006) er að finna nánari upplýsingar um þessi verkferli. Að því er varðar gögn, sem eru ekki samræmi við kröfur varðandi leitniprófun með stiglækkun, er hægt að nota Dunnett-prófun eða Tamhane-Dunnett (T3)-prófun, sem eru báðar með innbyggða aðlögun vegna margfalds samanburðar. Í þessum prófunum er gengið út frá normleika og, ef um er að ræða Dunnett-prófun, einsleitni dreifni. Ef þessi skilyrði eru ekki uppfyllt er hægt að nota stikalausa Dunn-prófun. Í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (2006) eru nánari upplýsingar um allar þessar prófanir. Á mynd 2 er yfirlit yfir það hvernig eigi að velja prófun.

Klakin hrogn og lifun seiða

Gögnin sýna hlutfall hrogna sem klekjast eða seiða sem lifa í hverri samhliða prófun fyrir sig. Meta skal þessi hlutföll með tilliti til aukalegs tvíliðubreytileika, sem er algengur en ekki almennur í slíkum mælingum. Flæðiritið í mynd 3 er leiðbeinandi fyrir val á prófun; sjá nánari skýringar í textanum.

Alla jafna eru notaðar tvenns konar prófanir. Þær eru C(α)-prófun Tarones (Tarone 1979) og kí-kvaðrat-prófanir, sem eru notaðar, hver fyrir sig, á hvern prófunarstyrk. Ef aukalegur tvíliðubreytileiki finnst í svo mikið sem einum prófunarstyrk skal nota aðferðir sem taka tillit til þess.

Formúla1

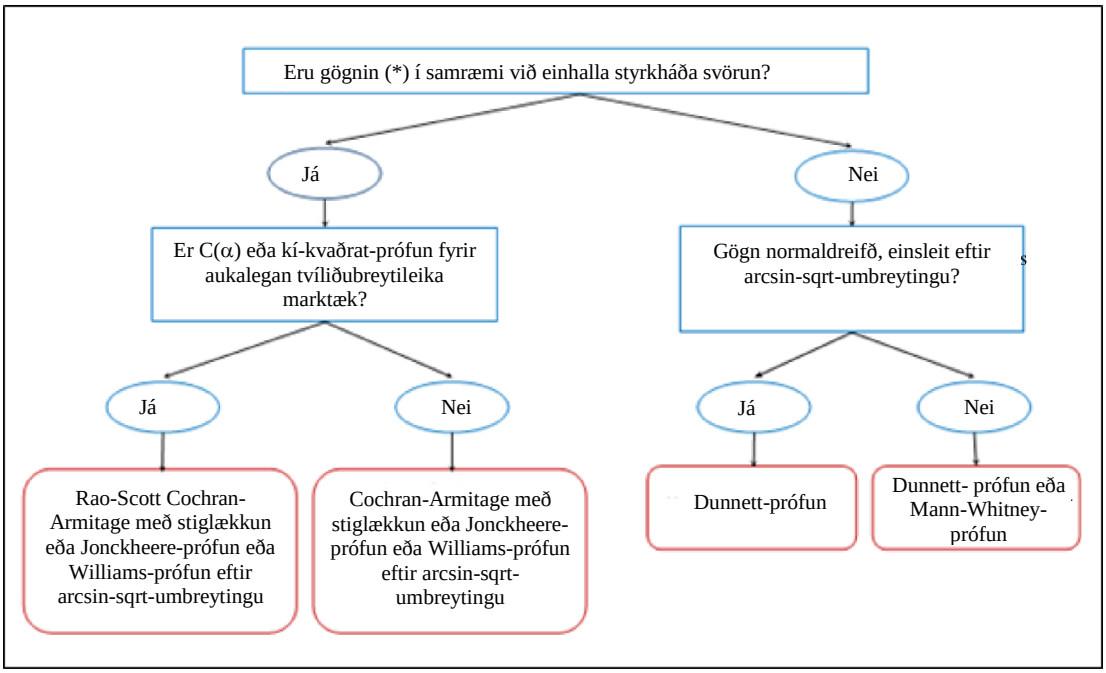
C(α)-prófun Tarones (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{\left(x_j - n_j \hat{p}\right)^2}{\hat{p}\,(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j-1)\right\}^{1/2}}$$

þar sem $\hat{p}$ er meðaltal hlutfalls fyrir tiltekinn styrk, **m** er fjöldi samhliða kerja, $\mathbf{n_j}$ er fjöldi viðfangsefna í samhliða prófun **j** og $\mathbf{x_j}$ er fjöldi viðfangsefna í þeirri samhliða prófun sem sýna svörun, t.d. óklaktir eða dauðir. Þessi prófun er notuð á hvern prófunarstyrk fyrir sig. Líta má á þessa prófun sem aðlagaða kí-kvaðrat-prófun en takmarkaðar styrkhermingar (e. *limited power simulations*), sem Tarone framkvæmdi, sýndu að hún er öflugri en kí-kvaðrat-prófun.

Mynd 3

NOEC– flæðirit yfir hrognaklak og dánartíðni seiða



(*) Gögn svara til hlutfalls samhliða prófana

Ef engin marktæk vísbending finnst um aukalegan tvíliðubreytileika er hægt að nota Cochran-Armitage-prófun með stiglækkun. Í þessari prófun er litið framhjá samhliða prófunum þannig að ef slíkar vísbendingar liggja fyrir er í Rao-Scotts-aðlöguninni á Cochran-Armitage-prófuninni (RSCA) tekið tillit til samhliða prófana, stærðar samhliða prófana og aukalegs tvíliðubreytileika og mælt er með henni. Aðrar prófanir eru m.a. Williams-prófun með stiglækkun og Jonckheere-Terpstra-prófun og Dunnett-prófun eins og lýst er fyrir stærðarmælingar. Þessar prófanir eiga við, sama hvort aukalegur tvíliðubreytileiki er fyrir hendi eða ekki, en styrkur þeirra er örlítið minni (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao og Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Fyrsti eða síðastur dagur klaks eða þegar seiðin synda upp

Svörunin er heil tala, sem tilgreinir prófunardaginn þegar viðkomandi athugun var gerð í tilteknu keri samhliða prófunar. Gildasviðið er alla jafna mjög takmarkað og hlutfall bundinna gilda er oft hátt, t.d. er sami fyrsti dagur klaks athugaður í öllum samhliða samanburðarprófunum og e.t.v. í einum eða tveimur lágum prófunarstyrkleikum. Stikabundnar prófanir, s.s. Williams og Dunnett, henta ekki fyrir slík gögn. Jonckheere-Terpstra-prófun með stiglækkun er mjög öflug til að greina áhrif prófunaríðefnis nema vísbendingar séu um að svörun sé langt frá því að vera einhalla. Annars er hægt að nota Dunn-prófun.

Afbrigðileiki hjá seiðum

Svörunin er fjöldi seiða sem eru að einhverju leyti afbrigðileg. Tíðni þessarar svörunar er yfirleitt lág og hún inniheldur eitthvað af sömu vandamálum og fyrsti dagur klaks og sýnir einnig óreglulega styrkháða svörun af og til. Ef gögnin fylgja lögun einhalla styrks a.m.k. gróflega er Jonckheere-Terpstra-prófun með stiglækkun mjög öflug til að greina áhrif. Annars er hægt að nota Dunn-prófun.

HEIMILDIR:

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

———

6. viðbætir

TÖLFRÆÐILEGAR LEIÐBEININGAR FYRIR AÐHVARFSMÖT

Almennt

Athuganirnar sem eru notaðar til aðlaga líkan eru meðaltöl í samhliða prófunum (lengd og þyngd) eða hlutföll í samhliða prófunum (klakin hrogn og dánartíðni seiða) (Efnahags- og framfarastofnunin 2006).

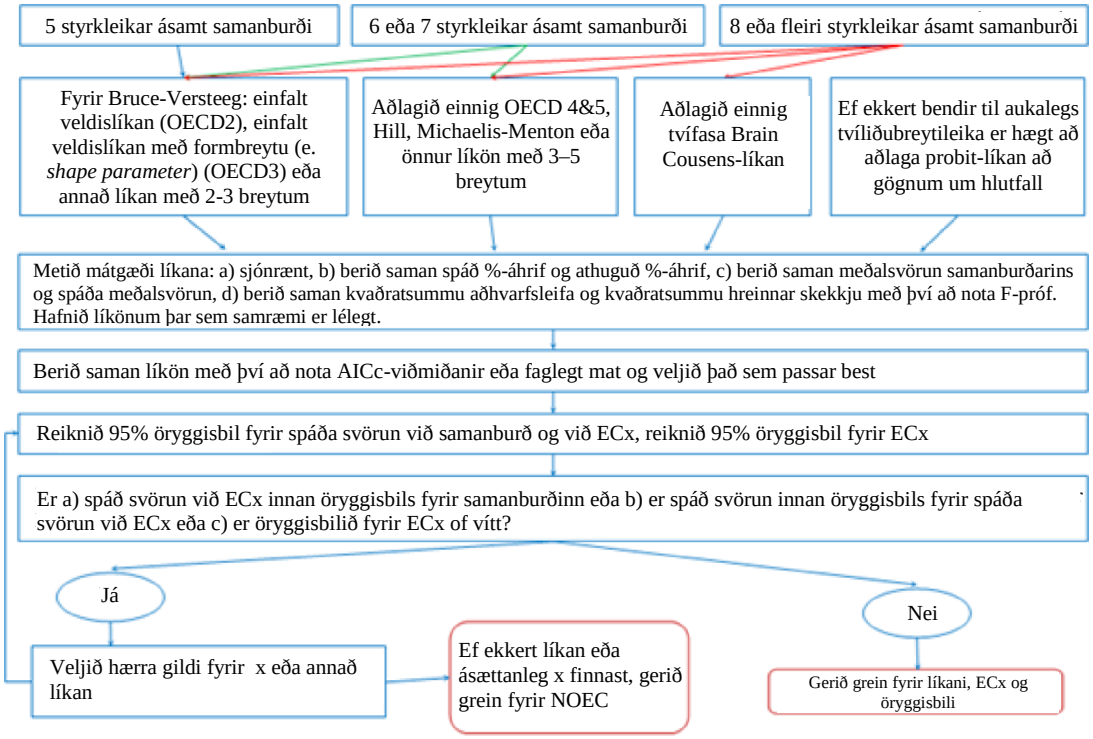
Alla jafna er mælt með veginni aðhvarfsgreiningu þar sem stærð sýnis úr samhliða prófun er notuð sem vægi. Aðrar vegnar aðferðir koma til greina, s.s. að nota spáða meðalsvörun eða sambland af henni sem vægi auk stærðar sýnis í samhliða prófun. Ekki er mælt með að nota umhverft gildi fyrir dreifni innan sýnis við tiltekinn styrk (e. *reciprocal of within-concentration sample variance*) sem vægi (Bunke *et al.* 1999, Seber og Wild 2003, Motulsky og Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Í öllum vörpunum á svörunum áður en greining fer fram skal viðhalda óhæði athugana og ECx og öryggismörk þess skulu gefin upp í upprunalegum mælingareiningum, fremur en í vörpuðum einingum. Til dæmis samsvarar 20% breyting á logra lengdar ekki 20% breytingu á lengd (Lyles *et al.* 2008, Draper og Smith 1999).

Flæðiritið í mynd 4 sýnir yfirlit fyrir mat á ECx. Nánari upplýsingar eru gefnar í textanum hér á eftir.

Mynd 4

Flæðirit yfir mat á ECx fyrir meðallengd, -þyngd eða -hlutfall klaktra hrogna eða dánartíðni seiða í samhliða prófun, sjá nánari upplýsingar í textanum



Athuganir er varða klak hrogna og dánartíðni seiða

Að því er varðar klak hrogna og dánartíðni seiða er alla jafna best að aðlaga stiglækkandi líkan, nema verið sé að aðlaga með probit-líkani eins og lýst er hér á eftir. Það er að segja: gera skal líkan fyrir hlutfall hrogna sem klekjast ekki eða seiða sem drepast. Ástæðan fyrir þessu er sú að ECx vísar til styrks þar sem breyting jafngildir x% af meðalsvörun samanburðarins. Ef 5% samanburðarhrogna klekjast ekki, og gert er líkan fyrir misheppnað klak, vísar EC_{20} til styrks þar sem verður breyting, sem jafngildir 20% af þessu 5% misheppnaða klaki í samanburðinum, og það er breyting sem nemur 0,2 × 0,05 = 0,01 eða 1 prósentustigi á móti 6% misheppnuðu klaki. Ekki er hægt að áætla svo litla breytingu á gagnlegan hátt út frá fyrirliggjandi gögnum og hún er ekki líffræðilega mikilvæg. Ef gert er líkan fyrir hlutfall hrogna sem klekjast væri hlutfall samanburðarins í þessu dæmi 95% og 20% minnkun m.t.t. meðaltals samanburðar yrði breyting sem nemur 0,95 × 0,2 = 0,18, þ.e.a.s. 95% árangur í klaki færi í 77% árangur í klaki (= 95–18) og þennan hrifstyrk er hægt að áætla og hann er að öllum líkindum þýðingarmeiri. Þetta er ekki til vandræða í stærðarmælingum þó að skaðleg áhrif á stærð feli alla jafna í sér minnkun á stærð.

Líkön fyrir stærð (lengd eða þyngd) og árangur í klaki hrogna eða lifun seiða

Öllum þessum líkönum er lýst og mælt með þeim í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (2006), að undanskildu tvífasa Brain-Cousens-líkaninu. Svokölluðum OECD-líkönum 2 til 5 er einnig lýst í Slob (2002) m.t.t. visteiturhrifatilrauna. Að sjálfsögðu eru mörg önnur líkön til sem gætu verið gagnleg. Í Bunke *et. al* (1999) eru tilgreind fjölmörg líkön sem ekki er fjallað um hér og tilvísanir í önnur líkön eru mjög margar. Þau sem eru tilgreind hér á eftir eru talin eiga einkar vel við í visteiturhrifatilraunum og notkun þeirra er útbreidd.

Með 5 prófunarstyrkleikum ásamt samanburði

— Bruce-Versteeg

— Einfalt veldislíkan (OECD 2)

— Veldislíkan með formbreytu (OECD 3)

— Einfalt veldislíkan með neðri mörkum (OECD 4)

Með 6 prófunarstyrkleikum ásamt samanburði

— Veldislíkan með formbreytu og neðri mörkum (OECD 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Ef sjónrænar vísbendingar eru um tvífasa (ólíklegt þegar hrogn klekjast eða seiði lifa en sést stundum í stærðarathugunum)

— Tvífasa Brain-Cousens; Brain og Cousens (1989)

Önnur líkön fyrir misheppnað klak hrogna og dánartíðni seiða

— Ef engar vísbendingar eru um aukalegan tvíliðubreytileika er hægt að aðlaga stighækkandi líkön fyrir þessar svaranir með probit- (eða tvíkosta) líkönum og hlutfall í samanburðum er áætlað í aðlögun líkansins. Þetta er ekki ákjósanlegasta aðferðin því í henni er farið með einstaklinginn, ekki samhliða prófunina, sem greiningareininguna (Morgan 1992, O'Hara Hines og Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Mátgæði einstaks líkans

— Berið sjónrænt saman hundraðshlutfall minnkunar, sem kom í ljós við hvern prófunarstyrk, við spáð hundraðshlutfall minnkunar (Motulsky og Christopoulos 2004, Draper og Smith 1999).

— Berið kvaðratmeðaltal aðhvarfsskekkju saman við kvaðratmeðaltal hreinnar skekkju með F-prófi (Draper og Smith 1999).

— Athugið að sérhver liður í líkaninu sé talsvert frábrugðinn núlli (þ.e. ákvarðið hvort allir liðir líkansins séu mikilvægir), (Motulsky og Christopoulos 2004).

— Línurit yfir leifar úr aðhvarfi á móti prófunarstyrk, helst á log(conc) kvarða. Það á ekki að koma fram mynstur í þessu línuriti; punktarnir eiga að dreifast af handahófi umhverfis lárétta línu í hæð við núll.

— Meta skal gögnin með tilliti til normleika og einsleitni dreifni á sama hátt og tilgreint er í 5. viðbæti.

— Auk þess skal meta normleika leifa í aðhvarfslíkaninu með sömu aðferðum og tilgreindar eru í 5. viðbæti að því er varðar leifar úr dreifnigreiningu.

Samanburður á líkönum

— Nota skal AICc-viðmiðanir Akiakes. Lægri AICc-gildi gefa betri aðlögun og ef AICc(B)-AICc(A)≥10 er líkan A næstum því örugglega betra en líkan B (Motulsky og Christopoulos (2004)).

— Berið líkönin tvö sjónrænt saman eftir því hversu vel þau uppfylla viðmiðunina fyrir einstaka líkanið hér að framan.

— Meginreglan um sparsemi er ráðlögð en þá er notað einfaldasta líkanið sem passar tiltölulega vel við gögnin (Ratkowsky 1993, Lyles *et al.* 2008).

Gæði mats á ECx

Öryggisbil (CI) fyrir ECx skal ekki vera of vítt. Þörf er á tölfræðilegu mati til að ákvarða hversu vítt öryggisbilið má vera til að ECx sé ennþá nothæft. Hermun fyrir aðhvarfslíkön, sem eru aðlöguð að gögnum um klak hrogna og stærð, sýna að u.þ.b. 75% öryggisbila fyrir ECx (x = 10, 20 eða 30) ná ekki yfir meira en tvo prófunarstyrkleika. Þetta gefur almenna viðmiðunarreglu um það sem er ásættanlegt og hagnýtar leiðbeiningar um það sem raunhæft er að ná. Fjölmargir höfundar leggja áherslu á að gefa þurfi upp öryggisbil fyrir allar líkanbreytur og að víð öryggisbil fyrir breytur í líkani bendi til þess að líkönin séu óásættanleg (Ott og Longnecker 2008, Alvord og Rossio 1993, Motulsky og Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber og Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

Öryggisbilið fyrir ECx (eða aðra líkanbreytu) skal ekki innihalda núll (Motulsky og Christopoulos 2004). Þetta er það aðhvarf sem jafngildir minnsta marktæka mun sem oft er tilgreindur í tilgátuprófunaraðferðum (t.d. Wang *et al.* 2000). Það samsvarar einnig öryggisbili fyrir meðalsvörun við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif sem felur ekki í sér ekki meðaltal samanburðar. Spurningin er hvort áætlaðar breytur séu trúverðugar vísindalega séð. Ef t.d. öryggisbil fyrir y0 er ± 20%, er áætlað EC_{10} ekki trúverðugt. Ef líkanið spáir 20% virkni við styrk C og mesta greinda virkni við C og lægri styrkleika er 10% er EC_{20} ekki trúverðugt (Motulsky og Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

Ekki á að þurfa að framreikna ECx utan styrkbils jákvæðra styrkleika (Draper og Smith 1999, OECD 2006). Almennt viðmið getur t.d. verið að ECx sé ekki meira en u.þ.b. 25% undir lægsta styrk sem prófaður er eða yfir hæsta styrk sem prófaður er.

HEIMILDIR:

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

———

C.48 **Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 229 um prófanir (2012). Þörf til að þróa og fullgilda rannsókn á fiskum þar sem hægt er að greina íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi sprettur af áhyggjum af því að magn íðefna í umhverfinu geti valdið skaðlegum áhrifum, bæði á menn og villtar lífverur, vegna milliverkunar þessara íðefna á innkirtlakerfið. Efnahags- og framfarastofnunin hafði frumkvæði að forgangsaðgerð árið 1998 til að endurskoða fyrirliggjandi viðmiðunarreglur og þróa nýjar viðmiðunarreglur fyrir skimun og prófun á hugsanlega innkirtlatruflandi efnum. Einn þátturinn í aðgerðinni var að þróa viðmiðunarreglur um skimun fyrir íðefnum sem hafa áhrif á innkirtlakerfi fiska. Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum fór í gegnum umfangsmikið fullgildingarferli sem samanstóð af fjölsetrarannsóknum með völdum íðefnum til að sýna fram á mikilvægi hennar og áreiðanleika til að greina íðefni sem hafa áhrif á æxlun fiska með margs konar gangvirki, þ.m.t. innkirtlakerfi (1.–5. heimild). Allir endapunktar í OECD-viðmiðunarreglu um prófanir voru fullgiltir á breiðkolli og hlutmengi endapunkta var fullgilt á japönskum rískarpa (þ.e. vítellógenín og annars stigs kyneinkenni) og sebradanna (þ.e. vítellógenín). Fullgildingarstarfið var að hluta til jafningjarýnt af nefnd sérfræðinga sem landsbundnir samræmingaraðilar um prófunarleiðbeiningaáætlun OECD tilnefndu (6. heimild) og af óháðri nefnd sérfræðinga sem Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna tilnefndi (29. heimild). Rannsókninni er ekki ætlað að greina sértæk gangvirki hormónatruflana vegna þess að tilraunadýrin eru með óskaddaðan undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxul sem gæti brugðist við íðefnum sem hafa áhrif á mismunandi svæði á þeim öxli.

2. Í þessari prófunaraðferð er lýst skimunargreiningu í lífi þar sem kynþroska hængum og hrygnum er haldið saman og látin verða fyrir váhrifum af íðefni í takmarkaðan tíma á lífsferli þeirra (21 dagur). Við lok 21. dags váhrifatímabilsins eru tvö lífmerki mæld sem endapunktar í karl- og kvendýrum sem eru mælikvarðar á virkni prófunaríðefnisins á innkirtla; þessir endapunktar eru vítellógenín og annars stigs kyneinkenni. Vítellógenín er mælt í breiðkolli, japönskum rískarpa og sebradanna en annars stigs kyneinkenni eru mæld í breiðkolli og japönskum rískarpa. Að auki er daglegt eftirlit haft með megindlegri frjósemi meðan prófunin stendur yfir. Kynkirtlar eru einnig varðveittir og e.t.v. framkvæmt vefjameinafræðilegt mat til að meta æxlunarhæfni tilraunadýranna og til að bæta við vægi rökstuddra vísbendinga varðandi aðra endapunkta.

3. Þessi lífgreining er notuð sem æxlunarskimunargreining í lífi og beiting hennar skal skoðuð með tilliti til „Hugtakaramma Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir prófun og mat á innkirtlatruflandi íðefnum“ (30. heimild). Í þessum hugtakaramma er lagt til að skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum sé á 3. stigi eins og greining í lífi sem veitir upplýsingar um valið eða valin gangvirki/valinn eða valda ferla innkirtlastarfsemi.

ATRIÐI, SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI, OG TAKMARKANIR

4. Vítellógenín (VTG) er yfirleitt framleitt í lifur eggbærra kvenkyns hryggdýra til að bregðast við innrænu estrógeni í blóðrásinni. Það er forefni eggjarauðuprótína og þegar lifrin hefur framleitt það færist það með blóðrásinni í hrognasekkina þar sem hrogn eru að þroskast, taka það upp og breyta því. Vítellógenín er næstum ógreinanlegt í blóðvökva óþroskaðra hænga og hrygna því þau hafa ekki nóg af estrógeni í blóðrásinni; þó er lifrin fær um að mynda og seyta vítellógenín til að bregðast við útrænni estrógenörvun.

5. Mælingar á vítellógeníni þjóna þeim tilgangi að greina íðefni með ýmiss konar estrógenverkunarhætti. Greining á estrógenvirkum íðefnum er möguleg með því að mæla vítellógenínvirkjun í hængum og hún hefur oft verið skjalfest í ritrýndum vísindaritum (t.d. 7. heimild). Einnig hefur verið sýnt fram á vítellógenínvirkjun í kjölfar váhrifa af arómavirkjanlegum andrógenum (8.–9. heimild). Minnkun á magni estrógens í blóðrás kvendýra, t.d. með arómatasahömlun sem umbreytir innrænum andrógenum í náttúrulega estrógenið 17β-estradíól, veldur minnkun á magni vítellógeníns sem er notað til að greina íðefni sem eru með arómatasahamlandi eiginleika (10.–11. heimild). Líffræðilegt mikilvægi vítellógenínsvörunar í kjölfar estrógen-/arómatasahömlunar hefur verið staðfest og víða skjalfest. Þó er mögulegt að framleiðsla á vítellógeníni hjá kvendýrum geti einnig orðið fyrir áhrifum af almennum eiturhrifum og verkunarháttum eiturhrifa sem hafa ekki áhrif á innkirtla, t.d. eiturhrifum á lifur.

6. Nokkrar mæliaðferðir hafa verið þróaðar með góðum árangri og staðlaðar til notkunar að staðaldri. Sú er raunin með tegundarbundnar ELISA-prófunaraðferðir þar sem ónæmisfrumuefnafræði er notuð til að magnákvarða vítellógenín sem myndast í litlum blóð- eða lifrarsýnum sem eru tekin úr einstökum fiskum (12.–18. heimild). Tekið er sýni úr blóði breiðkolls eða sebradanna eða úr jafningi úr haus/sporði og úr lifur rískarpa til að mæla vítellógenín. Í rískarpa er góð fylgni milli vítellógeníns sem mælist í blóði og í lifur (19. heimild). Í 6. viðbæti koma fram þær aðferðir sem mælt er með við söfnun sýna til greiningar á vítellógeníni. Sett til að mæla vítellógenín fást víða; slík sett skulu grundvallast á fullgiltri tegundarbundinni ELISA-aðferð.

7. Annars stigs kyneinkenni í hængum af tilteknum tegundum eru sýnileg utan á, mælanleg og næm fyrir styrk innrænna andrógena í blóðrásinni; sú er raunin með breiðkoll og rískarpa en ekki að því er varðar sebradanna sem býr ekki yfir mælanlegum annars stigs kyneinkennum. Kvendýr halda getu til að mynda karlkyns, annars stigs kyneinkenni þegar þau verða fyrir váhrifum af andrógenvirkum íðefnum í vatni. Fjölmargar rannsóknir eru tiltækar í birtum vísindaskrifum þar sem fjallað er um þess konar svörun í breiðkolli (20. heimild) og rískarpa (21. heimild). Minnkun á annars stigs kyneinkennum hjá karldýrum skal túlka með varúð vegna lítils tölfræðilegs styrks og skal byggð á sérfræðiáliti og vægi rökstuddra vísbendinga. Notkun sebradanna í þessari rannsókn er þeim takmörkunum háð að mælanleg annars stigs kyneinkenni, sem eru næm fyrir andrógenvirkum íðefnum, eru ekki fyrir hendi.

8. Hjá breiðkolli er fjöldi pörunarhnúta (e. *nuptial tubercles*) á trýni hrygna meginvísbendirinn um útræn andrógenvirk váhrif. Hjá rískarpanum er fjöldi tota helsta merkið um útræn váhrif á hrygnur af andrógenvirkum íðefnum. Í 5. viðbæti A og 5. viðbæti B eru tilgreindar þær aðferðir sem mælt er með að fylgt sé við mat á kyneinkennum hjá breiðkolli og rískarpa, eftir því sem við á.

9. Rannsókn á fiskum í 21 dag felur í sér mat á megindlegri hrognaframleiðslu og varðveislu kynkirtla til valkvæðrar vefjameinafræðilegrar rannsóknar. Sum eftirlitsyfirvöld kunna að krefjast þessa viðbótarendapunkts til að fá ítarlegra mat á æxlunarhæfni tilraunadýranna eða í tilvikum þar sem vítellógenín og annars stigs kyneinkenni sýndu ekki svörun við váhrifum frá íðefnum. Þó að e.t.v. sé auðvelt að greina suma endapunkta (t.d. vítellógenínvirkjun í hængum og myndun hnúta í hrygnum) eru ekki allir endapunktar (t.d. frjósemi og vefjameinafræðileg rannsókn á kynkirtlum) í rannsókninni ætlaðir til að greina á ótvíræðan hátt sértækan verkunarmáta á frumur. Þess í stað er unnt að draga ályktanir út frá röð endapunkta, sameiginlega, með tilliti til hugsanlegra innkirtlatruflana og veita þannig leiðbeiningar fyrir frekari prófanir. Þó að frjósemi sé ekki innkirtlasértæk er hún, sökum þess að sýnt hefur verið fram á næmi hennar gagnvart íðefnum sem vitað er að hafa áhrif á innkirtlastarfsemi (5. heimild), mikilvægur endapunktur til að taka með því ef hún og aðrir endapunktar verða ekki fyrir áhrifum er meiri vissa fyrir því að efnasamband hafi að öllum líkindum ekki áhrif á innkirtlastarfsemi. Ef frjósemi verður fyrir áhrifum mun það þó vega þungt í vægi rökstuddra vísbendinga. Leiðbeiningar um túlkun gagna og samþykki á prófunarniðurstöðum er að finna aftar í þessari prófunaraðferð.

10. Skilgreiningar sem eru notaðar í þessari prófunaraðferð er að finna í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

11. Í rannsókninni eru hængar og hrygnur í æxlunarástandi látin verða fyrir váhrifum saman í prófunarílátum. Staða þeirra sem fullvaxinna dýra í æxlunarástandi gerir það kleift að greina auðveldlega milli kynja og þar með að gera kynjatengdar greiningar á hverjum endapunkti og tryggir næmi þeirra gagnvart útrænum íðefnum. Við lok prófunar er kynið staðfest með stórsærri rannsókn á kynkirtlum eftir að afturbolurinn er opnaður kviðlægt með skærum. Yfirlit um viðeigandi skilyrði lífgreininga er að finna í 2. viðbæti. Yfirleitt er rannsóknin hafin með fiski sem tekinn er úr stofni sem er tilbúinn til hrygningar; ekki skal nota fisk sem er orðinn gamall. Leiðbeiningar um aldur fiska og

æxlunarástand eru gefnar í liðnum um val á fiskum. Rannsóknin er framkvæmd með því að nota þrjá váhrifastyrkleika íðefnis sem og vatnssamanburð og samanburð með leysi, ef nauðsyn krefur. Notuð eru tvö ílát eða samhliða prófunarílát fyrir hverja meðferð með sebradanna (hvert ílát inniheldur 5 hænga og 5 hrygnur). Notuð eru fjögur ílát eða samhliða prófunarílát fyrir hverja meðferð með breiðkolli (hvert ílát inniheldur 2 hænga og 4 hrygnur). Þetta er til að taka tillit til óðalsatferlis breiðkollshænga en halda styrk prófunarinnar fullnægjandi um leið. Notuð eru fjögur ílát eða samhliða prófunarílát fyrir hverja meðferð með rískarpa (hvert ílát inniheldur 3 hænga og 3 hrygnur). Váhrifin standa yfir í 21 dag og sýnataka úr fiskum fer fram á 21. váhrifadegi. Haft er daglegt eftirlit með megindlegri frjósemi.

12. Við sýnatöku á 21. degi eru öll dýrin aflífuð á mannúðlegan hátt. Annars stigs kyneinkenni eru mæld í breiðkolli og rískarpa (sjá 5. viðbæti A og 5. viðbæti B); tekin eru blóðsýni til að ákvarða vítellógenín í sebradanna og breiðkolli, að öðrum kosti er hægt að taka haus/sporð til að ákvarða vítellógenín í sebradanna (6. viðbætir); lifrin er tekin til að greina vítellógenín í rískarpa (6. viðbætir); kynkirtlar eru festir, annað hvort í heilu lagi eða skornir, fyrir hugsanlegt vefjameinafræðilegt mat (22. heimild).

VIÐMIÐANIR FYRIR SAMÞYKKT PRÓFUNAR

13. Prófunarniðurstöður eru aðeins samþykktar ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

— dánarhlutfall í vatnssamanburði (eða samanburði með leysi) skal ekki fara yfir 10% við lok váhrifatímabilsins,

— styrkur uppleysts súrefnis skal vera a.m.k. 60% af mettunargildi lofts á öllu váhrifatímabilinu,

— ekki má muna meira á vatnshitastiginu milli prófunaríláta en ± 1,5 °C á hverjum tíma á váhrifatímabilinu og skal viðhalda honum innan 2 °C frá því hitasviði sem er tilgreint fyrir prófunartegundina (2. viðbætir),

— sönnunargögn skulu liggja fyrir til að sýna fram á að styrkleikum prófunaríðefnisins í lausn hafi verið viðhaldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af meðaltali mæligilda,

— sannanir þess efnis að fiskarnir séu virkir í hrygningu í öllum ílátum samhliða prófunar áður en íðefnaváhrif hefjast og í samhliða samanburði meðan á prófun stendur.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

14. Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og einkum eftirfarandi:

a) súrefnis- og sýrustigsmælar,

b) búnaður til að ákvarða hörku vatns og basavirkni,

c) fullnægjandi tæki til að stýra hita, helst með stöðugri vöktun,

d) ker úr efnafræðilega óvirku efni og hæfilega stór miðað við ráðlagt hleðsluhlutfall og þéttleika (sjá 2. viðbæti),

e) hrygningarundirlag fyrir breiðkoll og sebradanna, nauðsynlegar upplýsingar eru gefnar í 4. viðbæti,

f) nægilega nákvæm vog (þ.e. nákvæmni upp á ± 0,5 mg).

Vatn

15. Nota má hvers kyns vatn sem prófunarvatn svo fremi prófunartegundin sýni þar nægilega lifun og vöxt til langs tíma. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. pH-gildið skal vera á bilinu 6,5– 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en ± 0,5 pH-stig. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunaríðefninu) skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mælingar skulu gerðar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} og SO_4^{2-}), varnarefnum (t.d. heildarmagni fosfórlífrænna og klórlífrænna varnarefna), heildarmagni lífræns kolefnis og heildarmagni svifagna, t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef sýnt hefur verið fram á að vatnsgæði hafi verið stöðug í a.m.k. eitt ár geta mælingar verið strjálli (t.d. á sex mánaða fresti). Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 3. viðbæti.

Prófunarlausnir

16. Prófunarlausnir af þeim styrkleikum, sem valdir eru hverju sinni, fást með því að þynna stofnlausn. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur (leysnisúlur) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Ekki er mælt með að nota leysi sem burðarefni. Ef nauðsynlegt er að nota leysi skal þó keyra samhliða samanburðarprófun með leysi með sama leysisstyrk og í meðhöndlununum með íðefni. Að því er varðar íðefni sem er erfitt að gera prófanir á getur leysir verið besta lausnin tæknilega séð; fletta skal upp í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (e. *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (23. heimild). Val á leysi ákvarðast af efnafræðilegum eiginleikum efnisins eða blöndunnar. Fara skal eftir hámarkinu 100 µl/l sem mælt er með í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar. Í nýlegri endurskoðun (24. heimild) er þó lögð áhersla á viðbótarathugunarefni í tengslum við notkun leysa til prófana á starfsemi innkirtla. Þess vegna er mælt með því að styrkur leysisins, ef hann er nauðsynlegur, sé lágmarkaður þegar það er tæknilega mögulegt (háð eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunaríðefnis).

17. Nota skal prófunarkerfi með gegnumstreymi. Slíkt kerfi skammtar stöðugt stofnlausn með prófunaríðefninu og þynnir hana (t.d. skammtadæla, hlutfallsþynningarbúnaður eða mettunarkerfi) í því skyni að flytja prófunarefni af mismunandi styrk í prófunarkerin. Kanna skal streymi stofnlausna og þynningarvatns reglulega, helst daglega, meðan prófunin stendur og í allri prófuninni skal frávik í streyminu ekki vera meira en 10%. Þess skal gætt að forðast notkun á plastslöngum eða öðru efni af litlum gæðum sem gæti innihaldið líffræðilega virk íðefni. Þegar efni er valið í gegnumstreymiskerfið skal hafa í huga hugsanlegt ásog prófunaríðefnisins á viðkomandi efni.

Eldi fisksins

18. Prófunarfiskurinn skal valinn úr hópi rannsóknarstofustofns, helst úr einum stofni, sem hefur verið aðlagaður í a.m.k. tvær vikur fyrir prófunina við skilyrði þar sem gæði vatns og lýsing eru svipuð því sem verður í prófuninni. Mikilvægt er að hleðsluhlutfall og þéttleiki dýranna (sjá skilgreiningar í 1. viðbæti) hæfi þeirri tegund sem er notuð í prófuninni (sjá 2. viðbæti).

19. Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili skal skrá dánartíðni og styðjast við eftirfarandi viðmiðanir:

— dánartíðni meiri en 10% af stofninum á sjö dögum: hafna skal allri lotunni,

— dánartíðni milli 5% og 10% af stofninum: aðlögun í sjö daga til viðbótar; ef dánartíðnin er meiri en 5% á næsta sjö daga tímabili: hafna skal allri lotunni,

— dánartíðni undir 5 % af stofninum á sjö dögum: lotan er ásættanleg.

20. Meðan á aðlögunartímabilinu, tímabilinu á undan váhrifum eða váhrifatímabilinu stendur skal ekki meðhöndla fiska við sjúkdómum.

Tímabil á undan váhrifum og val á fiskum

21. Mælt er með að dýrunum sé komið fyrir í ílátum, sem eru svipuð þeim sem eru notuð í prófuninni sjálfri, í eina til tvær vikur á undan váhrifum. Fóðra skal fiska að vild allan eldistímann og meðan váhrifafasinn stendur yfir. Váhrifafasanum er komið af stað með fullvöxnum fiskum með kynbundna tvíbreytni úr rannsóknarstofubirgðum af dýrum sem eru kynþroska (t.d. að því er varðar breiðkoll og rískarpa með greinilega sýnileg annars stigs kyneinkenni) og virk í hrygningu. Breiðkollar skulu, einungis að meginreglu til (og ekki til sérathugunar og aðskilið því að fylgjast með æxlunarástandi tiltekinnar fiskalotu), vera u.þ.b. 20 (± 2) vikna gamlir að því gefnu að þeir hafi verið ræktaðir við 25 ± 2 °C allan sinn líftíma. Japanskir rískarpar skulu vera u.þ.b. 16 (± 2) vikna gamlir að því gefnu að þeir hafi verið ræktaðir við 25 ± 2 °C allan sinn líftíma. Sebradannar skulu vera u.þ.b. 16 (± 2) vikna gamlir að því gefnu að þeir hafi verið ræktaðir við 26 ± 2 °C allan sinn líftíma. Meta skal hrognaframleiðslu daglega meðan á fasanum á undan váhrifunum stendur. Mælt er með því að fylgst sé með hrygningu í öllum kerjum fyrir samhliða prófanir áður en þau eru tekin inn í váhrifafasa rannsóknarinnar. Á þessu stigi er ekki unnt að veita megindlegar leiðbeiningar um æskilega hrognaframleiðslu á dag en það er tiltölulega algengt að sjá hrygningu sem nemur að meðaltali > 10 hrognum/hrygnu/á dag hjá hverri tegund. Nota skal handahófskennda tilhögun með hópa á grundvelli hrognaframleiðslu til að raða ílátum samhliða prófana á mismunandi tilraunastig til að tryggja jafna skiptingu samhliða prófana.

TILHÖGUN PRÓFUNAR

22. Þrír styrkleikar prófunaríðefnis, einn samanburður (vatn) og, ef þörf krefur, einn samanburður með leysi eru notaðir. Hægt er að greina gögnin til að ákvarða tölfræðilega marktækan mun milli svörunar í meðferðar- og samanburðarhóp. Þessar greiningar munu upplýsa um það hvort þörf er á frekari prófunum á íðefninu m.t.t. skaðlegra áhrifa til lengri tíma (þ.e. lifun, þroskun, vöxtur og æxlun) umfram þær sem notaðar eru í áhættumat (25. heimild).

23. Að því er varðar sebradanna skal á 21. degi tilraunarinnar taka sýni úr hængum og hrygnum á hverju meðhöndlunarstigi (5 hængar og 5 hrygnur í hvorri af samhliða prófununum tveimur) og úr samanburðinum til að mæla vítellógenín. Að því er varðar rískarpa skal á 21. degi tilraunarinnar taka sýni úr hængum og hrygnum á hverju meðhöndlunarstigi (3 hængar og 3 hrygnur í hverri af samhliða prófununum fjórum) og úr samanburðinum til að mæla vítellógenín og annars stigs kyneinkenni. Að því er varðar breiðkoll skal á 21. degi váhrifa taka sýni úr hængum og hrygnum (2 hængum og 4 hrygnum í hverri af samhliða prófununum fjórum) og úr samanburðinum til að mæla vítellógenín og annars stigs kyneinkenni. Gerð er krafa um megindlegt mat á frjósemi og festa skal vef úr kynkirtlum, í heilu lagi eða skorinn, fyrir hugsanlegt vefjameinafræðilegt mat, ef þess er krafist.

Val á prófunarstyrkleikum

24. Að því er varðar þessa prófun skal fastsetja hæsta prófunarstyrk við hámarksþolsstyrk (MTC), sem er ákvarðaður út frá ákvörðun á styrkbilum eða öðrum gögnum um eiturhrif, eða 10 mg/l eða hámarksleysni í vatni, eftir því hvert gildanna er lægst. Hámarksþolsstyrkur er skilgreindur sem hæsti prófunarstyrkur íðefnisins sem hefur í för með sér innan við 10% dánartíðni. Með þessari nálgun er gengið út frá því að til séu gögn um eiturhrif, sem byggð eru á athugunum, eða önnur gögn um eiturhrif sem hægt er að áætla hámarksþolsstyrkinn út frá. Mat á hámarksþolsstyrk getur verið ónákvæmt og alla jafna þarf sérfræðiálit af einhverju tagi.

25. Nauðsynlegt er að nota þrjá prófunarstyrkleika, á styrkbilum með föstum stuðli sem er ekki yfir 10, og samanburð með þynningarvatni (og samanburð með leysi, ef þörf krefur). Mælt er með röð bilstuðla milli 3,2 og10.

VERKFERLI

Val á prófunarfiski og vigtun hans

26. Brýnt er að breytileiki í þyngd fiskanna í upphafi rannsóknarinnar sé sem minnstur. Heppilegt stærðarbil fyrir þær mismunandi tegundir, sem mælt er með fyrir þessa prófun, er tilgreint í 2. viðbæti. Þyngd einstakra hænga og hrygna í allri lotunni, sem er notuð í prófuninni, má í upphafi prófunar helst ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd sama kyns. Mælt er með því undirúrtak fiskstofna sé vegið, áður en prófunin er gerð, til þess að áætla meðalþyngdina.

Váhrifaskilyrði

Tímalengd

27. Lengd prófunarinnar er 21. dagur í kjölfar tímabils á undan váhrifum. Tímabilið á undan váhrifum, sem mælt er með, er ein til tvær vikur.

Fóðrun

28. Fiskurinn skal fóðraður að vild með viðeigandi fóðri (2. viðbætir) og nægilega oft til þess að viðhalda líkamsástandi hans. Þess skal gætt að örverur nái ekki að þrífast og að vatnið verði ekki gruggugt. Að meginreglu til má skipta daglegum skammti í tvo eða þrjá jafnstóra skammta til að gefa í fleiri fóðrunum á dag með minnst 3 klst. millibili. Einn stærri skammtur er ásættanlegur, einkum um helgar. Fiskunum skal ekki gefið neitt fóður í 12 klukkustundir áður en sýni er tekið/krufning fer fram.

29. Meta skal fiskafóður m.t.t. þess hvort aðskotaefni eru í því, s.s. klórlífræn varnarefni, fjölhringa, arómatísk vetniskolefni, fjölklóruð bífenýl. Forðast skal fóður með hækkuð gildi plöntuestrógena sem tefla svörun rannsóknarinnar við þekktum estrógenörvum (t.d. 17β-estradíóli) í tvísýnu.

30. Fjarlægja skal óétið fóður og saurefni úr prófunarílátunum a.m.k. tvisvar í viku, t.d. með því að hreinsa botn hvers kers vandlega með vökvasugu.

Ljós og hiti

31. Haga skal ljóslotum og vatnshitastigi þannig að henti þeirri tegund sem er prófuð (sjá 2. viðbæti).

Tíðni magngreininga og mælinga

32. Áður en váhrifatímabilið hefst skal tryggja að íðefnagjafabúnaður starfi rétt. Allar greiningaraðferðir sem þörf er á skulu staðfestar, þ.m.t. að fullnægjandi þekking sé á efnafræðilegum stöðugleika í prófunarkerfinu. Meðan á prófuninni stendur er styrkur prófunaríðefnisins ákvarðaður með reglulegu millibili sem hér segir: kanna skal streymi þynningar- og eiturefnastofnlausnar, helst daglega en að lágmarki tvisvar í viku, og frávikið skal ekki vera meira en 10% í allri prófuninni. Mælt er með því að raunstyrkleikar prófunaríðefnisins séu mældir í öllum ílátum við upphaf prófunarinnar og vikulega eftir það.

33. Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef styrk prófunarefnis í lausn hefur verið haldið á fullnægjandi hátt innan ± 20% af nafnstyrk í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó annað hvort grundvallast á nafngildum eða mældum gildum.

34. Ef til vill þarf að sía sýni (t.d. með síu með opstærðinni 0,45 µm) eða setja þau í skilvindu. Ef þess þarf er skiljun það verklag sem mælt er með. Ef prófunarefnið ásogast ekki á síur er síun hins vegar viðunandi aðferð.

35. Í prófuninni skal mæla uppleyst súrefni, hitastig og sýrustig í öllum prófunarílátum a.m.k. einu sinni í viku. Mæla skal heildarhörku og basavirkni í samanburðarílátunum, og í einu íláti þar sem styrkurinn er mestur, a.m.k. einu sinni í viku. Helst skal vakta hitastigið stöðugt í a.m.k. einu prófunaríláti.

Athuganir

36. Nokkrar almennar svaranir (t.d. lifun) og líffræðilegar svaranir (t.d. vítellógeníngildi) eru metnar meðan rannsóknin stendur yfir eða þegar henni lýkur. Gerð er krafa um daglegt, megindlegt eftirlit með frjósemi. Mælingum og mati á þessum endapunktum og notagildi þeirra er lýst hér á eftir.

Lifun

37. Fiskurinn skal skoðaður daglega á prófunartímabilinu og skrá skal alla dauða fiska og fjarlægja þá eins fljótt og unnt er. Ekki skal setja nýja fiska í stað þeirra sem drepast, hvorki í samanburðar- eða meðhöndlunarílát. Ákvarða skal kyn fiska sem drepast meðan prófunin stendur yfir með stórsærri rannsókn á kynkirtlum.

Atferli og útlit

38. Allt óeðlilegt atferli skal skráð (miðað við samanburð); þetta getur tekið til einkenna um almenn eiturhrif, þ.m.t. oföndun, ósamstillt sund, jafnvægistap og ódæmigerð ró eða át. Því til viðbótar skal skrá ytri afbrigðileika (s.s. blæðing, óeðlilegur litur). Slík merki um eiturhrif skal kanna gaumgæfilega þegar gögn eru túlkuð þar eð þau geta verið vísbending um að lífmerki um starfsemi innkirtla séu ekki áreiðanleg við þá styrkleika. Atferlisfræðilegar athuganir af þessu tagi geta einnig gefið nytsamlegar eigindlegar upplýsingar sem geta haft áhrif á mögulegar kröfur um prófanir á fiski í framtíðinni. Til dæmis hefur orðið vart við óðalsárásargirni við váhrif af andrógenum hjá venjulegum breiðkollshængum eða breiðkollshrygnum með kyneinkenni hænga; hjá sebradanna dregur úr eða bælist eðlislægt pörunar- og hrygningaratferli eftir dagrenningu vegna estrógenvirkra eða and-andrógenvirkra váhrifa.

39. Þar eð sumir þættir í útliti (aðallega litur) geta breyst hratt við meðhöndlun er mikilvægt að gera eigindlegar athuganir áður en dýrin eru tekin úr prófunarkerfinu. Reynslan af breiðkolli fram að þessu bendir til þess að einhver íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi geti í upphafi framkallað breytingar á eftirfarandi ytri einkennum: skrokklit (ljós eða dökkur), litmynstri (lóðréttar rendur eru fyrir hendi) og skrokklögun (haus- og frambolshluti). Þess vegna skal fylgjast með útliti fisksins meðan prófunin stendur yfir og við lok rannsóknarinnar.

Frjósemi

40. Skrá skal megindlegar athuganir á hrygningu daglega fyrir hvert ílát samhliða prófunar. Hrognaframleiðsla skal skráð sem fjöldi hrogna/lifandi hrygnu/á dag í hverju íláti samhliða prófunar. Hrognin eru tekin daglega úr prófunarkerjunum. Setja skal hrygningarundirlag fyrir breiðkoll og sebradanna í prófunarkerin til að gera fiskunum kleift að hrygna við venjulegar aðstæður. Í 4. viðbæti er að finna nánari upplýsingar um hrygningarundirlag sem mælt er með fyrir sebradanna (4. viðbætir A) og breiðkoll (4. viðbætir B). Ekki er talið nauðsynlegt að útvega hrygningarundirlag fyrir rískarpa.

Aflífun fiska á mannúðlegan hátt

41. Á 21. degi, þ.e. við lok váhrifa, skal aflífa fiskinn á mannúðlegan hátt með viðeigandi magni af tríkaíni (tríkaínmetansúlfónat, metakaín, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l jafnað með 300 mg/l $NaHCO_3$ (natríumbíkarbónat, CAS.144-55-8) til að draga úr ertingu í slímhúð; síðan er tekið sýni úr blóði eða vef til að ákvarða vítellógenín, eins og útskýrt er í liðnum um vítellógenín.

Athugun á annars stigs kyneinkennum

42. Sum íðefni sem hafa áhrif á innkirtlastarfsemi geta framkallað breytingar á sértækum, annars stigs kyneinkennum (fjölda pörunarhnúta á breiðkollshængum, totumyndun á rískarpahængum). Nánar tiltekið geta íðefni með tiltekinn verkunarhátt valdið óeðlilegum annars stigs kyneinkennum í dýrum af hinu kyninu; t.d. geta andrógenviðtakaörvar s.s. trenbólon, metýltestósterón og díhýdrótestósterón valdið því að breiðkollshrygnur myndi áberandi pörunarhnúta eða að totur myndist á rískarpahrygnum (11., og 20.–21. heimild). Einnig hefur verið greint frá því að estrógenviðtakaörvar geti fækkað pörunarhnútum og minnkað hnakkahnúðinn á fullvöxnum breiðkollshængum (26.–27. heimild). Slíkar stórsæjar, formfræðilegar athuganir geta gefið nytsamlegar eigindlegar og megindlegar upplýsingar sem geta haft áhrif á mögulegar kröfur um prófanir á fiski í framtíðinni. Fjölda og stærð pörunarhnúta á breiðkolli og totumyndun á rískarpa er hægt að telja beint eða, á þægilegri hátt, á varðveittum sýnishornum. Í 5. viðbæti A og 5. viðbæti B, eftir því sem við á, eru tilgreindar þær aðferðir sem mælt er með til að meta annars stigs kyneinkenni hjá breiðkolli og rískarpa.

Vítellógenín

43. Blóði er safnað úr sporðslagæð/-bláæð með heparínmeðhöndlaðri hárpípu fyrir blóðkornaskil, (e. *heparinised microhematocrit capillary tubule*) eða að öðrum kosti með hjartaástungu með sprautu. Magn blóðs sem hægt er að safna, háð stærð fisksins, er yfirleitt á bilinu 5–60 µl úr hverjum einstaklingi fyrir sig að því er varðar breiðkoll og 5–15 µl úr hverjum einstaklingi fyrir sig að því er varðar sebradanna. Blóðvökvinn er aðskilinn frá blóðinu með skiljun og geymdur með prótínkljúfalötum við – 80 °C þangað til hann er greindur m.t.t. vítellógeníns. Að öðrum kosti er lifrin úr rískarpanum notuð og hægt er að nota jafning úr haus-/sporði af sebradanna sem vefjagjafa til að ákvarða vítellógenín (6. viðbætir). Mælingar á vítellógeníni skulu byggjast á fullgiltri, raðkvæmri ELISA-aðferð þar sem notuð eru raðkvæmir vítellógenínstaðlar og raðkvæm mótefni. Mælt er með því að nota aðferð sem getur greint vítellógeníngildi niður í örfá ng/ml af blóðvökva (eða ng/mg af vef) sem eru bakgrunnsgildin fyrir hænga sem hafa ekki orðið fyrir váhrifum.

44. Gæðaeftirlit með vítellógeníngreiningu fer fram með notkun staðla, blanksýna og greiningum á a.m.k. tveimur eins sýnum. Keyra skal prófun á áhrifum frá efniviði (áhrifum af þynningu sýnis) fyrir hverja ELISA-aðferð til að ákvarða lágmarksþynningarstuðul sýnisins. Hver ELISA-bakki, sem er notaður í vítellógeníngreiningu, skal innihalda eftirfarandi samanburðarsýni: a.m.k. 6 kvörðunarstaðla sem ná yfir röð þeirra vítellógenínstyrkleika sem búist er við og a.m.k. eitt blanksýni fyrir ósérhæfða bindigreiningu (greind í tveimur eins sýnum). Gleypni þessara blanksýna skal vera minni en 5% af hámarksgleypni kvörðunarstaðalsins. Að minnsta kosti tveir deiliskammtar (tvö eins sýni úr holubakka) af hverri þynningu sýnis eru greindir. Tvö eins sýni úr holubakka með meira en 20% frávik skal greina aftur.

45. Fylgnistuðullinn (R^2) fyrir kvörðunarferla skal vera hærri en 0,99. Þó er mikil fylgni ekki nægileg til að tryggja fullnægjandi spá um styrkleika í öllum bilum. Til viðbótar við nægilega mikla fylgni kvörðunarferilisins skal styrkurinn í hverjum staðli, eins og hann er reiknaður út frá kvörðunarferlinum, vera á bilinu 70–120% af nafnstyrk hans. Ef nafnstyrkurinn leitar frá kvörðunaraðhvarfslínunni (t.d. við lægri styrkleika) getur verið nauðsynlegt að skipta kvörðunarferlinum í lítil og stór bil eða nota ólínulegt líkan til að gleypnigögnin komist fyrir með fullnægjandi hætti. Ef ferillinn er klofinn skal $R^2 > 0,99$ gilda fyrir báða hluta línunnar.

46. Greiningarmörk eru skilgreind sem styrkur lægsta efnagreiningarstaðals og magngreiningarmörk eru skilgreind sem styrkur lægsta efnagreiningarstaðals, margfaldaður með lægsta þynningarstuðlinum.

47. Hvern þann dag sem vítellógeníngreiningar eru framkvæmdar skal greina styrkingarsýni sem er gert með því að nota viðmiðunarstaðal milli prófana (7. viðbætir). Gerð verður grein fyrir hlutfallinu milli styrks sem búist er við og mælds styrks ásamt niðurstöðum úr hverri röð greininga sem eru framkvæmdar þann dag.

Mat á vefjameinafræðilegri greiningu kynkirtla

48. Eftirlitsyfirvöld gera e.t.v. kröfu um vefjameinafræðilega greiningu kynkirtla til að skoða marklíffærið á undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxli (HPG) eftir váhrif frá íðefnum. Að því er þetta varðar eru kynkirtlarnir annað hvort festir í heilu lagi eða skornir. Þegar gerð er krafa um vefjameinafræðilega greiningu er leitað að sérstakri innkirtlatengdri svörun kynkirtlanna í mati á virkni prófunaríðefnisins á innkirtla. Þessi greiningarsvörun felur óhjákvæmilega í sér tilvist eggfruma í eistum, stækkun millivefsinnseytifruma eista (e. *Leydig cell hyperplasia*), minnkaða rauðumyndun, fjölgun sáðstofnfruma og eggbúsgrenndarofvöxt (e. *perifollicular hyperplasia*). Aðrar vefjaskemmdir á kynkirtlum, s.s. eggfrumudauði (e. *oocyte atresia*), eistnahrörnun og stigbreytingar geta verið af ýmsum orsökum. Í leiðbeiningarskjali um vefjameinafræðilega greiningu á fiskum eru tilgreindar aðferðir sem verða notaðar við krufningu, festingu, sneiðingu og vefjameinafræðilegt mat á kynkirtlum (22. heimild).

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Mat á lífmerkjasvörunum með dreifnigreiningu (ANOVA)

49. Til að sanngreina hugsanlega virkni íðefnis er svörun milli meðhöndlunar- og samanburðarhópa borin saman með dreifnigreiningu. Ef notaður er samanburður með leysi skal gera viðeigandi tölfræðilega prófun til að bera saman samanburðina fyrir þynningarvatnið og leysinn fyrir hvern endapunkt. Leiðbeiningar um meðhöndlun á gögnum um samanburð þynningarvatns og leysis í síðari, tölfræðilegri greiningu er að finna í OECD, 2006c (28. heimild). Greina skal öll gögn um líffræðilega svörun og gera grein fyrir þeim aðskilið eftir kyni. Ef nauðsynlegar forsendur fyrir stikabundnum aðferðum eru ekki uppfylltar — ekki eðlileg dreifing (t.d. Shapiro-Wilks-prófun) eða misleit dreifni (Bartletts- eða Levenes-prófun) — skal vega og meta hvort vörpun á gögnunum væri rétt til að gera dreifnina einsleita, áður en dreifnigreiningin er gerð, eða að nota vegna dreifnigreiningu. Hægt er að nota Dunnett-próf (stikabundið) eða margfaldan samanburð para eða Mann-Whitney með Bonferroni-aðlögun (óstikabundin) fyrir skammtasvörun sem er ekki einhalla. Hægt er að nota önnur tölfræðileg próf (t.d. Jonckheere-Terpstra-próf eða Williams-próf) ef skammtasvörunin er u.þ.b. einhalla. Í 8. viðbæti er að finna tölfræðilegt flæðirit sem hjálpar við að ákveða hvaða tölfræðilegu prófun er hentugast að nota. Einnig er hægt að fá viðbótarupplýsingar í skjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif (e. *OECD Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*) (28. heimild).

Skýrslugjöf um niðurstöður úr prófunum

50. Í rannsóknargögnum skal koma fram:

Prófunarstöð:

— ábyrgðaraðilar og rannsóknarábyrgð þeirra

— hver rannsóknarstofa skal hafa sýnt fram á hæfni við að nota röð dæmigerðra íðefna

Prófunaríðefni:

— lýsing á eiginleikum prófunaríðefnis

— eðlisástand og viðeigandi, eðlisefnafræðilegir eiginleikar

— aðferð við tilreiðslu prófunarstyrkleika og tíðni þeirra

— upplýsingar um stöðugleika og lífbrjótanleika

Leysir:

— lýsing á eiginleikum leysis (eðli, styrkur sem er notaður)

— rök fyrir vali á leysi (öðrum en vatni)

Tilraunadýr:

— tegund og stofn

— birgir og tiltekin starfsstöð birgis

— aldur fiska við upphaf prófunarinnar og ástand m.t.t. æxlunar/hrygningar

— upplýsingar um aðferð við aðlögun dýranna

— líkamsþyngd fiska við upphaf váhrifa (úr undirsýni úr fiskstofni)

Prófunaraðstæður:

— prófunaraðferð sem notuð er(tegund prófunar, hleðsluhlutfall, þéttleiki dýra o.s.frv.)

— aðferð við tilreiðslu á stofnlausnum og streymi

— nafnstyrkleikar í prófuninni, styrkleikar prófunarlausna mældir vikulega og greiningaraðferð sem er notuð, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik í prófunarílátunum og staðfesting á því að mælingarnar eigi við styrkleika prófunarefnisins í eiginlegu lausninni

— eiginleikar þynningarvatnsins (þ.m.t. sýrustig, harka, basavirkni, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa, heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir og niðurstöður úr öllum öðrum mælingum sem eru gerðar)

— gæði vatns í prófunarílátum, sýrustig, harka, hitastig og styrkur uppleysts súrefnis

— ítarlegar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruni, magn sem er gefið og tíðni og greining á viðeigandi aðskotaefnum ef hún liggur fyrir (t.d. fjölklóruð bífenýl, fjölhringa, arómatísk vetniskolefni og klórlífræn varnarefni)

Niðurstöður

— sannanir þess efnis að samanburðurinn uppfylli samþykktarviðmiðanir prófunarinnar

— gögn um dánartíðni við alla prófunarstyrkleika og í öllum samanburði

— tölfræðilegar greiningaraðferðir, sem eru notaðar, vinnsla gagna og rökstuðningur fyrir þeim aðferðum sem eru notaðar

— gögn um líffræðilegar athuganir á stórsæju formi og byggingu, þ.m.t. annars stigs kyneinkenni, hrognaframleiðsla og vítellógenín

— niðurstöður úr greiningu á gögnum, helst sett fram í töflum og myndrænt

— öll tilvik þess að fiskur sýni óvenjulega svörun og öll sýnileg áhrif sem prófunaríðefnið kallar fram.

LEIÐBEININGAR UM TÚLKUN OG SAMÞYKKI Á PRÓFUNARNIÐURSTÖÐUNUM

51. Í þessum lið eru nokkur atriði sem taka skal tillit til við túlkun á niðurstöðum úr prófunum fyrir þá mismunandi endapunkta sem mældir voru. Túlka skal niðurstöðurnar með gát ef prófunaríðefnið virðist valda augljósum eiturhrifum eða hafa áhrif á almennt ástand tilraunadýrsins.

52. Þegar prófunarstyrkleikasviðið er ákveðið skal þess gætt að fara ekki yfir hámarksþolsstyrk til að unnt sé að túlka gögnin á marktækan hátt. Mikilvægt er að vera með a.m.k. einn meðhöndlunarhóp þar sem eru engin merki um eiturhrif. Meta skal merki um sjúkdóma og eiturhrif gaumgæfilega og gera grein fyrir þeim. Til dæmis er mögulegt að framleiðsla á vítellógeníni hjá kvendýrum geti einnig orðið fyrir áhrifum af almennum eiturhrifum og verkunarháttum eiturhrifa sem hafa ekki áhrif á innkirtla, t.d. eiturhrifum á lifur. Önnur meðhöndlunarstig sem eru ótrufluð af altækum eiturhrifum geta þó styrkt túlkun á áhrifum.

53. Hafa þarf nokkra þætti í huga við samþykkið á prófunarniðurstöðum. Sem viðmiðun ættu vítellógeníngildin í samanburðarhópum hænga og hrygna að vera greinileg og aðgreind með u.þ.b. þremur tugaþrepum fyrir breiðkoll og sebradanna og u.þ.b. einu tugaþrepi fyrir rískarpa. Dæmi um gildissvið sem koma fyrir í samanburðar- og meðhöndlunarhóp er að finna í fullgildingarskýrslum (1.–4. heimild). Há vítellógeníngildi í samanburðarhængum geta haft áhrif á svörunargetu greiningarinnar og getu hennar til að greina veika estrógenörva. Lág vítellógeníngildi í samanburðarhrygnum geta haft áhrif á svörunargetu greiningarinnar og getu hennar til að greina arómatasahömlun og estrógenblokka. Fullgildingarrannsóknirnar voru notaðar til að semja leiðbeiningarnar.

54. Að því er varðar magnákvörðun á hrognaframleiðslu þá er hún háð mikilvægum frávikum [frávíksstuðullinn (CV) getur verið á bilinu 20–60%] sem geta haft áhrif á getu rannsóknarinnar til að greina marktækan samdrátt, sem er undir 70%, í hrognaframleiðslu þegar frávíksstuðullinn nálgast 50% eða meira. Þegar frávíksstuðullinn takmarkast við lægri gildi (u.þ.b. 20–30%) verður styrkur rannsóknarinnar til að greina 40–50% samdrátt í hrognaframleiðslu ásættanlegur (80%). Sú tilhögun prófunar sem er notuð fyrir breiðkoll, þ.m.t. fjórar samhliða prófanir fyrir hvert meðhöndlunarstig, ætti að veita endapunktinum frjósemi meiri styrk, samanborið við tilhögun prófunar með einungis tveimur samhliða prófunum.

55. Ef rannsóknarstofa hefur ekki framkvæmt rannsóknina áður eða ef umtalsverðar breytingar (t.d. breytingar á fiskstofni eða birgi) hafa verið gerðar er ráðlegt að framkvæma rannsókn á tæknilegri hæfni. Mælt er með því að notuð séu íðefni sem hafa margs konar verkunarhætti eða áhrif á fjölda prófunarendapunktanna sem eru notaðir. Í raun er hver rannsóknarstofa hvött til þess að byggja upp sín eigin rannsóknarsögulegu samanburðargögn fyrir hænga og hrygnur og til að framkvæma prófun með jákvæðu viðmiðunaríðefni m.t.t. estrógenvirkni (t.d. 17β-estraíól við 100 ng/l, eða þekktur, veikur örvi) sem leiðir til aukins vítellógeníns í hængum, jákvæðu viðmiðunaríðefni m.t.t. arómatasahömlunar (t.d. fadrósól eða próklóras við 300 µg/l) sem leiðir til minna vítellógeníns í hrygnum og jákvæðu viðmiðunaríðefni m.t.t. andrógenvirkni (t.d. 17β-trenbólon við 5 µg/l) sem leiðir til virkjunar annars stigs kyneinkenna í breiðkolls- og rískarpahrygnum. Öll þessi gögn er hægt að bera saman við tiltæk gögn úr fullgildingarrannsóknum (1.–3. heimild) til að tryggja hæfni rannsóknarstofunnar.

56. Almennt séð ættu mælingar á vítellógeníni að teljast jákvæðar ef það er tölfræðilega marktæk aukning á vítellógeníni í hængum ($p < 0,05$) eða tölfræðilega marktæk minnkun í hrygnum ($p < 0,05$), a.m.k. við hæsta skammt sem er prófaður, samanborið við samanburðarhópinn og ef merki um almenn eiturhrif eru ekki fyrir hendi. Jákvæð niðurstaða er staðfest enn frekar með því að sýna fram á líffræðilega trúverðugt samband milli skammtsins og svörunarferilsins. Eins og áður hefur komið fram þarf minnkun vítellógeníns ekki að stafa að öllu leyti frá innkirtlum; þó ætti almennt að túlka jákvæðar niðurstöður sem vísbendingu um innkirtlastarfsemi í lífi og ætti að jafnaði að hrinda af stað aðgerðum til að afla frekari skýringa.

57. Sum eftirlitsyfirvöld kunna að krefjast vefjameinafræðilegs greiningarmats á kynkirtlum til að ákvarða æxlunarhæfni tilraunadýranna og til að unnt sé að gera mat á prófunarniðurstöðum m.t.t. vægis rökstuddra vísbendinga. Ef til vill er ekki nauðsynlegt að framkvæma vefjameinafræðilega greiningu á kynkirtlum í tilvikum þar sem annað hvort vítellógenín eða annars stigs kyneinkenni eru jákvæði (þ.e. aukning eða minnkun á vítellógeníni eða virkjun annars stigs kyneinkenna).

HEIMILDIR:

1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531-539.

17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as "signposts", not "traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

1. viðbætir

SKAMMSTAFANIR OG SKILGREININGAR:

Íðefni: efni eða blanda.

CV: frávikstuðull.

ELISA: ELISA-prófun.

Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxull (HPG): Undirstúku-, heiladinguls- og kynkirtlaöxull.

Hleðsluhlutfall: blautvigt fiska miðað við rúmmál vatns.

Hámarksþolsstyrkur: Hámarksþolsstyrkur, sem nemur u.þ.b. 10% af LC_{50}.

Þéttleiki fiska: fjöldi fiska miðað við rúmmál vatns.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Vítellógenín (VTG): fosfólípóglýkóprótínforefni eggjarauðuprótíns sem er yfirleitt fyrir hendi í kynþroska kvendýrum af öllum eggbærum tegundum.

———

2. viðbætir

TILRAUNASKILYRÐI FYRIR SKIMUNARGREININGU Á INNKIRTLUM FISKA

1. Ráðlagðar tegundir	Breiðkollur (*Pimephales promelas*)	Rískarpi (*Oryzias latipes*)	Sebradanni (*Danio rerio*)
2. Tegund prófunar	Gegnumstreymi	Gegnumstreymi	Gegnumstreymi
3. Vatnshitastig	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Lýsing	Flúrperur (breitt róf)	Flúrperur (breitt róf)	Flúrperur (breitt róf)
5. Ljósstyrkur	10–20 μE/m^2/s, 540-1 000 lúx eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofuumhverfinu)	10–20 μE/m^2/s, 540-1 000 lúx eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofuumhverfinu)	10–20 μE/m^2/s, 540-1 000 lúx eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofuumhverfinu)
6. Ljóslota (umskipti með birtingu/rökkri eru valkvæð en þó ekki talin nauðsynleg)	Birta í 16 klst., myrkur í 8 klst.	Birta í 12–16 klst., myrkur í 12–8 klst.	Birta í 12–16 klst., myrkur í 12–8 klst.
7. Hleðsluhlutfall	< 5 g á hvern l	< 5 g á hvern l	< 5 g á hvern l
8. Stærð prófunarkerja	10 l (lágmark)	2 l (lágmark)	5 l (lágmark)
9. Rúmmál prófunarlausnar	8 l (lágmark)	1,5 l (lágmark)	4 l (lágmark)
10. Rúmmálsútskipti prófunarlausna	Að lágmarki 6 á dag	Að lágmarki 5 á dag	Að lágmarki 5 á dag
11. Aldur prófunarlífvera	Sjá 21. lið.	Sjá 21. lið.	Sjá 21. lið.
12. Áætluð blautvigt fullvaxins fisks (g)	Hrygnur: 1,5 ± 20% Hængar: 2,5 ± 20%	Hrygnur: 0,35 ± 20% Hængar: 0,35 ± 20%	Hrygnur: 0,65 ± 20% Hængar: 0,4 ± 20%
13. Fjöldi fiska í hverju prófunaríláti	6 (2 hængar og 4 hrygnur)	6 (3 hængar og 3 hrygnur)	10 (5 hængar og 5 hrygnur)
14. Fjöldi meðhöndlana	= 3 (ásamt viðeigandi samanburðum)	= 3 (ásamt viðeigandi samanburðum)	= 3 (ásamt viðeigandi samanburðum)
15. Fjöldi íláta í hverri meðhöndlun	Að lágmarki 4	Að lágmarki 4	Að lágmarki 2
16. Fjöldi fiska á hvern prófunarstyrk	16 fullvaxnar hrygnur og 8 hængar (4 hrygnur og 2 hængar í hverju keri samhliða prófunar)	12 fullvaxnar hrygnur og 12 hængar (3 hrygnur og 3 hængar í hverju keri samhliða prófunar)	10 fullvaxnar hrygnur og 10 hængar (5 hrygnur og 5 hængar í hverju keri samhliða prófunar)

17. Fóðrunarfyrirkomulag	Lifandi eða frosnar saltvatnsrækjur, fullvaxnar eða krabbalirfur, tvisvar eða þrisvar á dag (að vild), fóður af almennum markaði eða sambland af ofangreindu.	Saltvatnsrækjur, fullvaxnar eða krabbalirfur, tvisvar eða þrisvar á dag (að vild), fóður af almennum markaði eða sambland af ofangreindu.	Saltvatnsrækjur, fullvaxnar eða krabbalirfur, tvisvar eða þrisvar á dag (að vild), fóður af almennum markaði eða sambland af ofangreindu.
18. Loftun	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af mettun lofts	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af mettun lofts	Engin nema styrkur uppleysts súrefnis falli undir 60% af mettun lofts
19. Þynningarvatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn	Hreint yfirborðsvatn, brunnvatn eða endurgert vatn eða afklórað kranavatn
20. Tímabil á undan váhrifum	Mælt er með 7–14 dögum	Mælt er með 7–14 dögum	Mælt er með 7–14 dögum
21. Tímalengd váhrifa af íðefni	21 dagur	21 dagur	21 dagur
22. Líffræðilegir endapunktar	— lifun — atferli — frjósemi — annars stigs kyneinkenni — vítellógenín — valkvæð vefjameinafræðileg greining kynkirtla	— lifun — atferli — frjósemi — annars stigs kyneinkenni — vítellógenín — valkvæð vefjameinafræðileg greining kynkirtla	— lifun — atferli — frjósemi — vítellógenín — valkvæð vefjameinafræðileg greining kynkirtla
23. Til að prófun sé samþykkt	Uppleyst súrefni ≥ 60% af mettun; meðalhiti 25 ± 2 °C; 90% lifun fiska í samanburðarhópunum; mældir prófunarstyrkleikar innan 20% af meðaltali mæligilda á hvert meðhöndlunarstig.	Uppleyst súrefni ≥ 60% af mettun; meðalhiti 25 ± 2 °C; 90% lifun fiska í samanburðarhópunum; mældir prófunarstyrkleikar innan 20% af meðaltali mæligilda á hvert meðhöndlunarstig.	Uppleyst súrefni ≥ 60% af mettun; meðalhiti 26 ± 2 °C; 90% lifun fiska í samanburðarhópunum; mældir prófunarstyrkleikar innan 20% af meðaltali mæligilda á hvert meðhöndlunarstig.

3. viðbætir

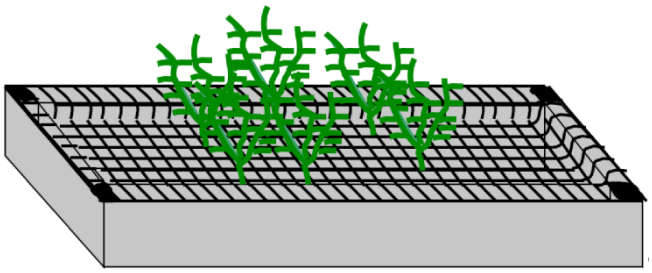
NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

EFNISÞÁTTUR	STYRKLEIKAR
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

4. viðbætir A

HRYGNINGARUNDIRLAG FYRIR SEBRADANNA

Hrygningarbakki: tækjabakki úr gleri, t.d. 22 × 15 × 5,5 cm (l × b × d), lokaður með vírgrind úr ryðfríu stáli sem hægt er að taka af (2mm möskvar). Grindin skal ná yfir tækjabakkann og sitja neðan við brúnina.



Hrygningarundirlaginu skal komið fyrir á grindinni. Það ætti að mynda umhverfi fyrir fiskinn til að fara í. Til dæmis eru gervivatnaplöntur úr grænu plastefni hentugar (ath: hafa skal í huga hugsanlegt ásog prófunaríðefnisins á plastefnið). Plastefnið skal skolað í nægu magni af volgu vatni nægilega lengi til að tryggja að engin íðefni losni út í prófunarvatnið. Þegar gler er notað skal tryggja að fiskarnir meiðist ekki né heldur sé þrengt að þeim við kröftugar hreyfingar.

Fjarlægð milli bakka og glerplatna skal vera a.m.k. 3 cm til að tryggja að hrygning verði ekki utan bakkans. Hrogn sem er hrygnt á bakkann falla gegn um grindina og hægt er að taka þau 45–60 mínútum eftir að þau byrja að lýsast. Glæru hrognin loða ekki saman og auðvelt er að telja þau með því að nota lárétt ljós. Þegar 5 hrygnur eru í íláti teljast hrogn allt að 20 á dag sem fá, allt að 100 sem í meðallagi og yfir 100 sem mikill fjöldi. Fjarlægja skal hrygningarbakkann, safna hrognunum og setja hrygningarbakkann aftur í prófunarílátið, annað hvort eins seint að kvöldi og unnt er eða mjög snemma morguns. Ekki skal líða meira en ein klukkustund þangað til bakkinn er settur í aftur því annars getur hrygningarundirlagið orðið hvati til að virkja einstaklingsbundna pörun og hrygningu á óvenjulegum tímum. Ef skilyrðin eru þau að hrygningarbakkann þarf að setja síðar í skal það gert a.m.k. 9 klukkustundum eftir að kviknar á lýsingunni. Það seint að degi er hvati til hrygningar liðinn.

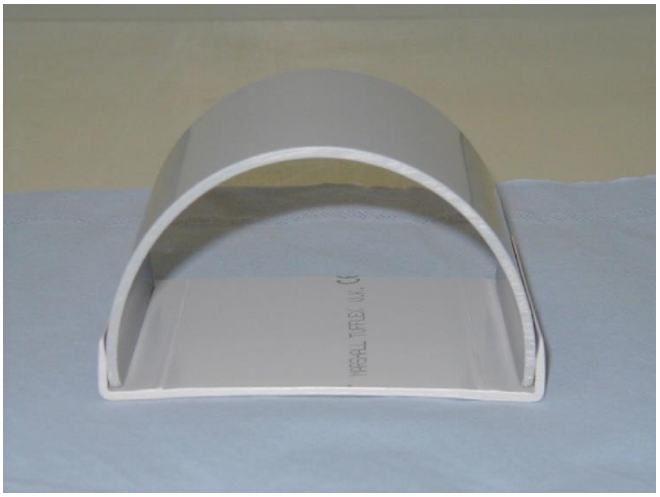
———

4. viðbætir B

HRYGNINGARUNDIRLAG FYRIR BREIÐKOLL

Tvær eða þrjár samsettar hrygningarplötur og -bakkar úr plasti/leir/gleri eða ryðfríu stáli eru sett í hvert prófunarker (t.d. 80 mm löng grá hálfhringlaga renna sem liggur á 130 mm löngum bakka með kanti) (sjá mynd). Komið hefur í ljós að rétt hertar (e. *seasoned*) plötur úr pólývínýlklóríði eða leir henta sem hrygningarundirlag (Thorpe o.fl., 2007).

Mælt er með því að plöturnar séu hrufóttar til að bæta viðloðun. Einnig skal setja skilrúm um bakkann til að koma í veg fyrir að fiskarnir komist að hrognunum sem hafa fallið í gegn nema sýnt hafi verið fram á viðloðunarhæfni hrognanna í viðkomandi hrygningarundirlagi.



Undirstaðan er hönnuð til að halda öllum hrognum sem festast ekki við yfirborð plötunnar og myndu þar af leiðandi falla til botns í kerinu (eða hrognum sem hrygnt er beint á flatan plastbotninn). Skola skal allt hrygningarundirlag í a.m.k. 12 klukkustundir í þynningarvatni fyrir notkun.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

5. viðbætir A

MAT Á ANNARS STIGS KYNEINKENNUM Í BREIÐKOLLI TIL AÐ GREINA TILTEKIN ÍÐEFNI SEM HAFA ÁHRIF Á INNKIRTLASTARFSEMI

Yfirlit

Útlitseiginleikar, sem geta verið mikilvægir í prófunum á innkirtlatruflandi efnum að því er varðar fullvaxna breiðkolla, eru m.a. bollitur (þ.e. ljós/dökkur), litmunstur (þ.e. eru lóðréttar rendur fyrir hendi eða ekki), líkamslögun, (þ.e. lögun á haus og frambolshluta, þrútinn kviður) og sértæk annars stigs kyneinkenni (þ.e. fjöldi og stærð pörunarhnúta, stærð hnakkahnúðs og hrygningarpípu).

Pörunarhnútar eru staðsettir á haus (hnakkahnúð) kynþroska breiðkollshænga og raðast yfirleitt í tvíhliða samhverft mynstur (Jensen o.fl. 2001). Samanburðarhrygnur og ungviði af báðum kynjum mynda enga hnúta (Jensen o.fl. 2001). Það geta verið allt að átta stakir hnútar umhverfis augun og á milli nasaopanna á hængunum. Flestu og stærstu hnútarnir liggja í tveimur samhliða línum beint neðan við nasaopin og ofan við kjaftinn. Á mörgum fiskum er hópur af hnútum undir neðri kjálkanum; hnútar sem eru næstir kjaftinum eru yfirleitt stakt par en hnútar nær kviðnum geta verið allt að fjórir saman í hóp. Raunverulegur fjöldi hnúta fer sjaldnast yfir 30 (á bilinu 18–28) (Jensen o.fl. 2001). Hnútarnir, sem eru mest áberandi (í fjölda), eru stakir og tiltölulega kringlóttir að lögun og hæðin nokkurn veginn sú sama og radíusinn. Flestir kynþroska hængar eru einnig með a.m.k. nokkra stækkaða og áberandi hnúta þannig að ekki er hægt að greina staka hnúta í þyrpingunni.

Sumar tegundir innkirtlatruflandi íðefna geta valdið óeðlilegum annars stigs kyneinkennum hjá hinu kyninu; t.d. geta andrógenviðtakaörvar, s.s. 17α-metýltestósterón eða 17β-trenbólon, valdið því að breiðkollshrygnur mynda pörunarhnúta (Smith 1974; Ankley o.fl. 2001; 2003) en estrógenviðtakaörvar geta fækkað pörunarhnútum á hængum eða minnkað þá (Miles-Richardson o.fl. 1999; Harries o.fl. 2000).

Hér á eftir er lýsing á eiginleikum pörunarhnúta á breiðkollum, byggð á verkferlum sem eru notaðir á rannsóknarstofu Umhverfisstofnunar Bandaríkjanna í Duluth, MN. Hægt er að skipta tilteknum vörum og/eða búnaði út fyrir sambærileg efni sem eru tiltæk.

Athuganir takast best ef notað er stækkunargler með ljósi eða krufningarsmásjá með ljósi og þrefaldri stækkun. Skoða skal fiskinn ofanfrá þannig að framhlutinn vísi fram (hausinn í áttina að þeim sem skoðar).

— Fiskurinn er settur í litla ræktunarskál (t.d. 100 mm í þvermál), hausinn vísar fram og kviðurinn snýr niður. Skerpa leitarans er stillt þannig að unnt sé að greina hnúta. Fiskinum er velt varlega og rólega til hliðanna til að greina hnútasvæði. Hnútar eru taldir og flokkaðir.

— Skoðunin er endurtekin með því að leggja fiskinn í ræktunarskál, kviðurinn látinn snúa upp og fremri hlutinn vísar fram.

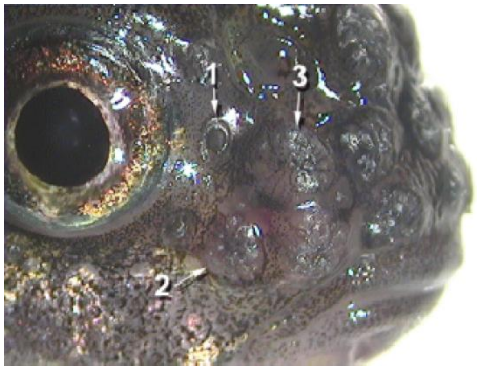
— Ljúka skal skoðuninni á hverjum fiski á innan við tveimur mínútum.

Talning og flokkun á hnútum

Sex sérstök svæði hafa verið greind til að meta tilvist og þroskun hnúta á fullvöxnum breiðkollshængum. Sniðmát var þróað til að kortleggja staðsetningu og fjölda hnúta sem eru til staðar (sjá lok þessa viðbætis). Fjöldi hnúta er skráður og hægt er að flokka stærð þeirra megindlega á eftirfarandi hátt: 0-ekki fyrir hendi, 1-fyrir hendi, 2-stækkaðir og 3-áberandi, fyrir hverja lífveru (mynd 1).

Flokkur 0 — engir hnúðar. Flokkur 1 — fyrir hendi, greindir þannig að allir hnúðar séu með einn punkt þar sem hæðin er næstum því jöfn radíusnum. Flokkur 2 — stækkaðir, greindir út frá vef sem líkist stjörnu í útliti, yfirleitt með stóran, hringhverfan grunnflöt með grópum eða skorum út frá miðjunni. Hæð hnúta er oft ójöfn en þeir geta af og til verið ávalir. Flokkur 3 — áberandi, yfirleitt mjög stórir og ávalir og uppbyggingin ekki eins vel afmörkuð. Af og til renna þessir hnútar saman og mynda samhangandi massa eftir einu svæði eða fleiri svæðum (B, C og D, lýst hér á eftir). Litur og útlit eru svipuð og í flokki 2 en eru af og til tilviljanakennd. Almennt séð mun notkun á þessu flokkunarkerfi leiða til heildarhnútastiga sem eru < 50 í venjulegum hæng í samanburðarhóp með hnútatöluna 18–20 (Jensen o. fl. 2001).

Mynd 1



Raunverulegur fjöldi hnúta á sumum fiskum getur verið meiri en í sniðmátsreitunum að því er varðar tiltekið flokkunarsvæði. Ef það gerist má bæta viðbótarflokkunartölum við í reitinn, hægra eða vinstra megin við hann. Þess vegna þarf sniðmátið ekki að vera samhverfa. Önnur tækni við að kortleggja hnúta, sem eru í pörum eða tengdir saman lóðrétt eftir láréttum fleti kjaftsins, gæti verið sú að tvímerkja tvö hnútaflokkunarstig í einn reit.

Kortlagningarsvæði:

A — Hnútar umhverfis augun. Kortlagt frá baki að kviði umhverfis augntóftina framanverða. Yfirleitt margir á fullorðnum samanburðarhængum, ekki fyrir hendi í samanburðarhrygnum, yfirleitt í pörum (einn við hvort auga) eða stakir á hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum af andrógenum.

B — Hnútar á milli nasaopanna (skynrásaop, e. *sensory canal pores*). Yfirleitt í pörum á samanburðarhængum og meira áberandi þroskaðir (2-stækkaðir eða 3-áberandi). Ekki fyrir hendi á samanburðarhrygnum en þó kemur fyrir að þeir þroskast á hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum af andrógenum.

C — Hnútar beint framan við nasaopin, samhliða kjaftinum. Yfirleitt stækkaðir eða áberandi á fullvöxnum samanburðarhængum. Fyrir hendi eða stækkaðir á minna þroskuðum hængum eða andrógenmeðhöndluðum hrygnum.

D — Hnútar samhliða meðfram kjaftinum. Yfirleitt metnir sem þroskaðir á samanburðarhængum. Ekki fyrir hendi á samanburðarhrygnum en finnast á hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum frá andrógenum.

E — Hnútar á neðri kjálka, nálægt kjafti, yfirleitt litlir og yfirleitt í pörum. Breytilegir á samanburðarhængum eða meðhöndluðum hængum og meðhöndluðum hrygnum.

F — Hnútar kviðlægt við E. Yfirleitt litlir og í pörum. Fyrir hendi í samanburðarhængum og hrygnum sem hafa orðið fyrir váhrifum frá andrógenum.

HEIMILDIR:

1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Hnútasniðmát:

Au _____

Dags_____

Heildarstig _____

Flokkun í tölum

1-fyrir hendi

2-stækkaðir

3-áberandi

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

_____

5. viðbætir B

MAT Á ANNARS STIGS KYNEINKENNUM Í RÍSKARPA TIL AÐ GREINA TILTEKIN ÍÐEFNI SEM HAFA ÁHRIF Á INNKIRTLASTARFSEMI

Hér fyrir neðan er lýsing á mælingum á totumyndun(*), sem eru annars stigs kyneinkenni hjá rískarpa (*Oryzias latipes*).

1) Þegar lifrin hefur verið skorin úr (6. viðbætir) er fiskurinn settur í keilulaga tilraunaglas sem inniheldur u.þ.b. 10 ml af 10% formalíni með hlutlausum jafna (upp: haus, niður: sporður). Ef kynkirtlar eru festir í annarri lausn en 10% formalíni með hlutlausum jafna skal skera með rakvélarblaði þvert á fiskinn, milli fremri hluta raufaruggans og gotraufarinnar, og þess gætt að skadda ekki kynopið (e. *gonopore*) og kynkirtilinn sjálfan (mynd 3). Fiskurinn er settur þannig í að haushlutinn á fiskbolnum liggi í festiefnislausn til að varðveita kynkirtilinn og sporðhlutinn af fiskbolnum í 10% formalíni með hlutlausum jafna eins og lýst er hér að ofan.

2) Eftir að fiskbolurinn hefur verið settur í 10% formalín með hlutlausum jafna skal taka um fremri hluta raufaruggans með töng og halda ugganum útteygðum í u.þ.b. 30 sekúndur. Þegar gripið er um raufaruggann með töng skal taka varlega um nokkra geisla uggans á fremri hlutanum og gæta þess að skaða ekki toturnar.

3) Eftir að raufarugganum hefur verið haldið útteygðum í u.þ.b. 30 sekúndur skal setja fiskbolinn í 10% formalín með hlutlausum jafna við stofuhita þar til totumyndunin er mæld (framkvæma skal mælingar eftir festingu í a.m.k. 24 klst.).

Mæling

1) Eftir að fiskbolurinn hefur verið í festingu í 10% formalíni með hlutlausum jafna í a.m.k. 24 klst skal taka bolinn úr keilulaga tilraunaglasinu og þerra formalínið með síupappír (eða pappírsþurrku).

2) Fiskurinn er lagður þannig að kviðurinn snúi upp. Síðan er raufarugginn klipptur varlega með litlum krufningarskærum (ákjósanlegast er að klippa raufaruggann af ásamt svolitlu magni af brjóski úr uggafestingunni (e. *pterygiophore*).

3) Tekið er um fremri hluta sundurskorna raufaruggans með töng og hann settur á sýnisgler með nokkrum dropum af vatni. Síðan er þekjugler lagt yfir raufaruggann. Þegar tekið er um raufaruggann með töng skal þess gætt að skráma ekki toturnar sem hafa myndast.

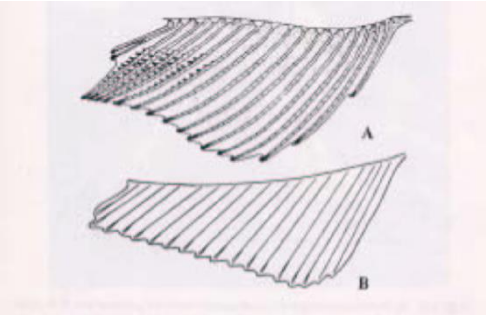
4) Fjöldi liðflata, sem totur hafa myndast á, er talinn með teljara undir lífgreiningarsmásjá (e. *biological microscope*) (lóðrétt smásjá eða umhverfð smásjá). Totumyndunin þekkist á því að litlar totur hafa myndast og eru sýnilegar á aftari brún liðflatarins. Skrá skal fjölda liðflata með totumyndun á hverjum geisla uggans á vinnuplaggið (t.d. fyrsti geisli uggans: 0, annar geisli uggans: 10, þriðji geisli uggans: 12, o.s.frv.) og færa summu talnanna inn í excelskjalið fyrir hvern fisk. Ef nauðsyn krefur skal taka ljósmynd af raufarugganum og telja fjölda liðflata, sem totur hafa myndast á, á myndinni.

5) Eftir mælinguna skal setja raufaruggann í keilulaga tilraunaglasið sem lýst er í (1. heimild) og geyma.

(*) Totur myndast yfirleitt einungis hjá fullvöxnum hængum og finnast á geislum ugganna frá öðrum til sjöunda eða áttunda geisla, talið frá aftari enda raufarugga (mynd 1 og 2). Hins vegar vaxa totur sjaldan á fyrsta geisla uggans frá aftari enda raufarugga. Þessi staðlaða verklagsregla felur í sér mælingar á totum á fyrsta geisla uggans (í þessari verklagsreglu á númerið á geisla uggans við um röðina frá aftari enda raufaruggans).

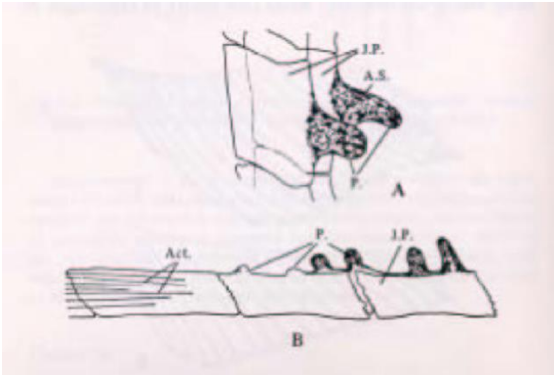
Mynd 1.

Skýringarmynd sem sýnir kynjamun á lögun og stærð raufaruggans. A, hængur; B, hrygna. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



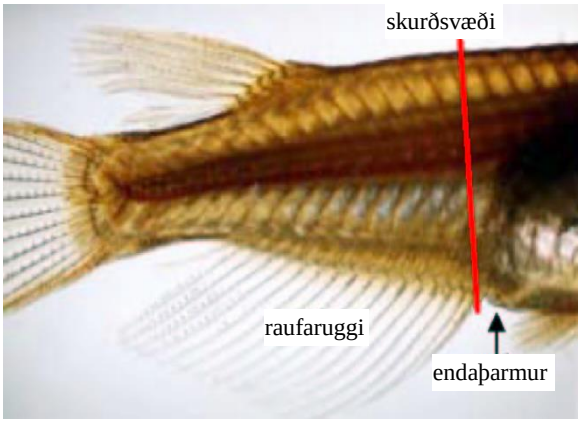
Mynd 2.

A, Totur á liðflötum geisla raufaruggans. J.P., liðplata; A.S., áslægt svæði; P., tota. B, ysti endi geisla uggans. Geislhárungar (e. *Actinotrichia*) (Act) eru á oddinum. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Mynd 3.

Ljósmynd af fiskbol sem sýnir skurðsvæðið þegar kynkirtillinn er festur í annarri festivökvalausn en 10% formalín með hlutlausum jafna. Í því tilviki er eftirstandandi bolhluti skorinn af með rakvélarblaði milli fremri hluta raufaruggans og raufarinnar (rautt strik) og höfuðhluti bolsins settur í festivökvalausn fyrir kynkirtilinn og sporðhluti fiskbolsins settur í 10% formalín með hlutlausum jafna.



———

6. viðbætir

AÐFERÐIR SEM MÆLT ER MEÐ VIÐ SÖFNUN SÝNA TIL GREININGAR Á VÍTELLÓGENÍNI

Þess skal gætt að forðast víxlmengun milli vítellógenínsýna úr hængum og hrygnum.

Verkferli 1A: Breiðkollur, blóðsöfnun úr sporðblæð/-slagæð

Eftir svæfingu er stirtlan skorin sundur að hluta til með skurðhnífi og blóði safnað úr sporðblæð/-slagæð með heparínmeðhöndlaðri hárpípu fyrir blóðkornaskil. Eftir að blóðinu hefur verið safnað er blóðvökvinn einangraður í flýti með skilvindu í 3 mínútur við 15 000 g (eða að öðrum kosti í 10 mín. við 15 000 g við 4 °C). Ef þess er óskað er hægt að ákvarða hundraðshlutfall blóðkornaskila eftir skiljun. Blóðvökvaskammturinn er síðan tekinn úr hárpípunni, sem er notuð við blóðkornaskilin, og geymd í skilvinduglasi með 0,13 einingum af aprótíníni (lati fyrir prótínkljúf) við – 80 °C þar til hægt er að ákvarða vítellógenínið. Magn blóðvökva, sem hægt er að safna (sem fer eftir kyni), háð stærð breiðkollsins, er yfirleitt á bilinu 5–60 míkrólítrar úr hverjum fiski (Jensen o.fl. 2001).

Verkferli 1B: Breiðkollur, blóðsöfnun úr hjartanu

Þá er einnig hægt að safna blóði með hjartaástungu með heparínmeðhöndlaðri sprautunál (1 000 einingar af heparíni á hvern ml). Blóðið er sett í Eppendorf-tilraunaglös (geymd á ís) og síðan skilið í skilvindu (5 mín., 7 000 g, stofuhiti). Setja skal blóðvökvann í hrein Eppendorf-tilraunaglös (í deiliskömmtum ef rúmmál blóðvökvans gerir það kleift) og frysta þegar í stað við – 80 °C þangað til greining fer fram (Panter o. fl., 1998).

Verkferli 2A: Japanskur rískarpi, lifur skorin úr rískarpa

Prófunarfiskur fjarlægður úr prófunarkeri

1) Fjarlægja skal prófunarfisk úr prófunarkeri með því að nota lítinn háf. Þess skal gætt að missa ekki prófunarfiskinn ofan í önnur prófunarker.

2) Að meginreglu til skal fjarlægja prófunarfiska í eftirfarandi röð: samanburður, samanburður með leysi (ef við á), minnsti styrkur, miðstyrkur, hæsti styrkur og jákvæður samanburður. Auk þess skal fjarlægja alla hænga úr einu prófunarkeri áður en hrygnurnar, sem eftir eru, eru fjarlægðar.

3) Kyn hvers prófunarfisks er sannreynt á grundvelli ytri, annars stigs kyneinkenna (t.d. lögun raufaruggans).

4) Prófunarfiskurinn er settur í flutningsílát og færður yfir á vinnustöðina í því skyni að skera lifrina úr. Gátað er að merkimiðar á prófunarkeri og flutningsíláti sé réttir og til að staðfesta að fjöldi fiska, sem voru fjarlægðir úr prófunarkerinu, og fjöldi fiska, sem eftir er í prófunarkerinu, sé sá sem búist var við.

5) Ef ekki er unnt að greina kynið út frá ytra útliti fisksins skal taka alla fiskana úr prófunarkerinu. Í því tilviki skal greina kynið með því að skoða kynkirtil eða annars stigs kyneinkenni í þrívíddarsmásjá.

Lifrin skorin úr

1) Prófunarfiskurinn er fluttur með litlum háfi úr flutningsílátinu yfir í svæfingarlausnina.

2) Eftir að búið er að svæfa prófunarfiskinn er hann tekinn með töng (venjulegri töng) og færður yfir á síupappír (eða pappírsþurrku). Þegar tekið er um prófunarfiskinn skal taka um báðar hliðar haussins með tönginni til að sporðurinn brotni ekki.

3) Vatnið er þerrað af yfirborði prófunarfisksins með síupappírnum (eða pappírsþurrkunni).

4) Fiskurinn er lagður þannig að kviðurinn snúi upp. Síðan er klipptur lítill þverskurður mitt á milli hálssvæðisins kviðmegin og miðjunnar á kviðsvæðinu með krufningarskærum.

5) Krufningarskærunum er stungið inn í litla skurðinn og klippt á kviðinn frá punkti sporðmegin við tálknmöttul (e. *branchial mantle*) eftir miðlínu kviðar að fremsta hluta gotraufar. Þess skal gætt að stinga krufningarskærunum ekki of djúpt inn til að forðast að skadda lifur og kynkirtla.

6) Eftirfarandi aðgerðir skulu fara fram undir þrívíddarsmásjá.

7) Prófunarfiskurinn er lagður á pappírsþurrku þannig að kviðurinn snúi upp (eða á petrískál úr gleri eða sýnisgler).

8) Kviðarholsveggirnir eru glenntir út með fínni töng og innri líffæri dregin út. Einnig má draga innri líffærin út með því að fjarlægja kviðarholsvegginn öðrum megin, ef þörf krefur.

9) Samtengdur hluti lifrar og gallblöðru er afhjúpaður með annarri fínni töng. Síðan er tekið um gallrásina og gallblaðran skorin frá. Þess skal gætt að sprengja ekki gallblöðruna.

10) Tekið er um vélindað og magi og þarmar skornir frá lifrinni á sama hátt. Þess skal gætt að innihald meltingarvegarins leki ekki út. Aftasti hluti meltingarvegarins er skorinn frá gotraufinni og tekinn úr kviðarholinu.

11) Fitumassi og annar vefur er skorinn utan af lifrinni. Þess skal gætt að skráma ekki lifrina.

12) Tekið er um lifrarportæðasvæðið (e. *hepatic portal area*) með fínni töng og lifrin fjarlægð úr kviðarholinu.

13) Lifrin er sett á sýnisglerið. Fína töngin er notuð til að fjarlægja alla umframfitu og utanaðkomandi vef af yfirborði lifrarinnar (t.d. holhimnu) ef þörf krefur.

14) Þyngd lifrar er mæld með 1,5 ml örtilraunaglasi (e. *microtube*) sem töru og á rafrænni fínvog. Gildið er skráð á vinnublaðið (aflestur: 0,1 mg). Staðfesta skal sanngreiningarupplýsingar á merkimiða örtilraunaglassins.

15) Lokinu á örtilraunaglasinu, sem inniheldur lifrina, er lokað. Geymið í kælistandi (eða ísstandi).

16) Þegar ein lifur hefur verið skorin úr skal hreinsa krufningaráhöldin eða skipta þeim út fyrir hrein áhöld.

17) Fjarlægja skal lifrina úr öllum fiskunum í flutningsílátinu eins og lýst er hér að framan.

18) Þegar lifrin hefur verið skorin úr öllum fiskunum í flutningsílátinu (þ.e. öllum hængum og hrygnum í prófunarkeri) skal setja öll lifrarsýnin í tilraunaglasastand með merkimiðum til auðkenningar og geyma hann í frysti. Þegar lifrar eru teknar til formeðhöndlunar skömmu eftir að þær eru skornar úr eru sýnin flutt yfir á næstu vinnustöð í kælistandi (eða ísstandi).

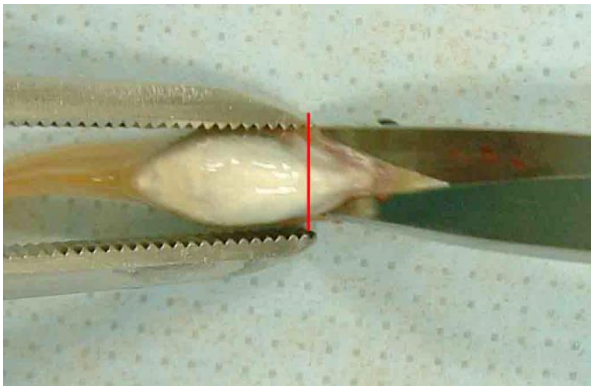
Eftir að lifrin hefur verið skorin úr má nota fiskskrokkinn til vefjafræðilegrar rannsóknar á kynkirtlum og mælinga á annars stigs kyneinkennum.

Sýni

Geyma skal lifrarsýnin, sem tekin eru úr prófunarfiskinum, við ≤ – 70 °C ef þau eru ekki notuð í formeðhöndlun skömmu eftir að þau eru skorin úr.

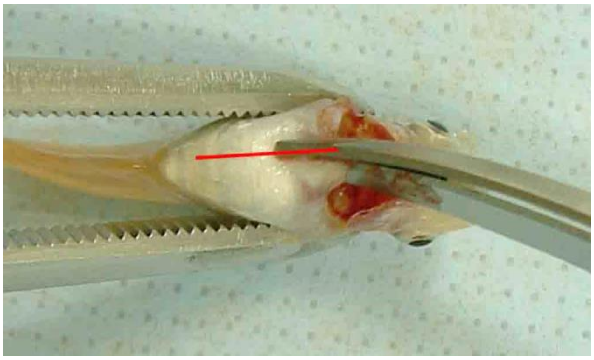
Mynd 1

Skurður er klipptur með skærum rétt framan við eyruggann



Mynd 2

Klippt er í miðlínu kviðar með skærum að punkti sem er u.þ.b. 2 mm framan við gotraufina

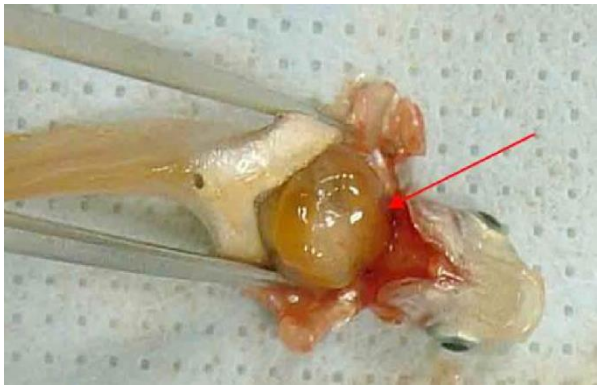


Mynd 3

Kviðveggirnir eru glenntir sundur með töng til að afhjúpa lifrina og önnur innri líffæri

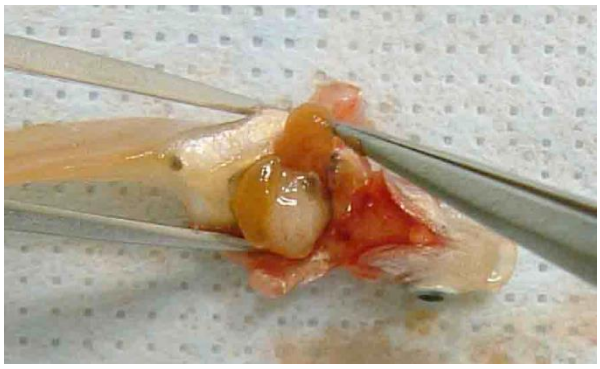
(Einnig má festa kviðveggina niður til hliðar).

Örin bendir á lifrina



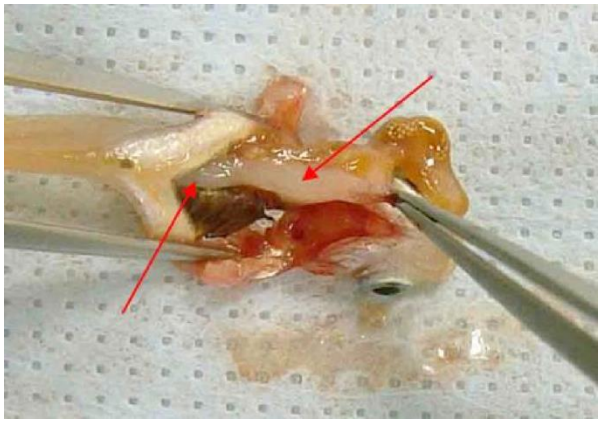
Mynd 4

Lifrin er klippt frá með töng og dregin út með henni



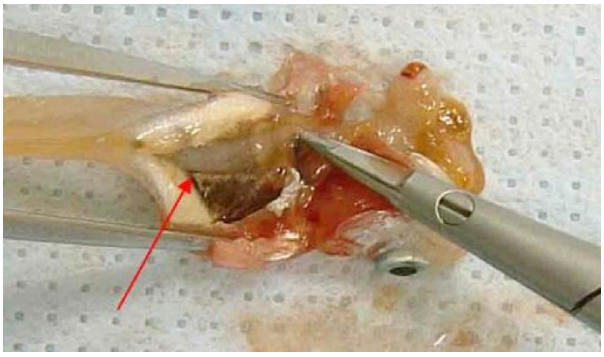
Mynd 5

Garnirnar eru dregnar varlega úr með töng



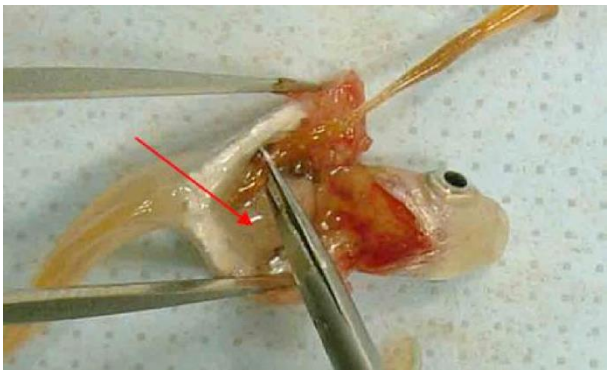
Mynd 6

Báðir endar garnanna og hugsanlegir áfastir hlutar garnahengisins eru klipptir frá með skærum



Mynd 7 (hrygna)

Verkferlið er hið sama fyrir hrygnuna



Mynd 8

Verkferli lokið



<u>Verkferli 2 B:</u> Japanskur rískarpi (*Oryzias latipes*), formeðhöndlun á lifur vegna greiningar á vítellógeníni

Flaskan með jafningsjafnalausninni er tekin úr ELISA-settinu og kæld með ískurli (hitastig lausnarinnar: ≤ 4 °C). Ef notuð er jafningsjafnalausn úr EnBio ELISA-kerfinu skal lausnin þídd við stofuhita og flaskan síðan kæld með ískurli.

Rúmmál jafningsjafnalausnarinnar er reiknað út á grundvelli þyngdar hennar (50 µl af jafningsjafnalausn er bætt við á hvert mg af þyngd lifrarinnar). Ef þyngd lifrarinnar er t.d. 4,5 mg er rúmmál jafningsjafnalausnarinnar fyrir lifrina 225 µl. Gera skal skrá yfir rúmmál jafningsjafnalausna fyrir allar lifrar.

Lifrin undirbúin fyrir formeðhöndlun

1) Taka skal 1,5 ml örtilraunaglasið með lifrinni úr frystinum rétt fyrir formeðhöndlunina.

2) Lifur úr hængum skal formeðhöndluð áður en lifur úr hrygnum er formeðhöndluð til að koma í veg fyrir vítellógenínmengun. Auk þess skal formeðhöndlun á prófunarhópum fara fram í eftirfarandi röð: samanburður, samanburður með leysi (ef við á), minnsti styrkur, miðstyrkur, hæsti styrkur og jákvæður samanburður.

3) Fjöldi 1,5 ml örtilraunaglasa, sem innihalda lifrarsýni og tekin eru úr frysti á tilteknu tímabili, skal ekki fara yfir þann fjölda sem hægt er að skilja í skilvindu á viðkomandi tímapunkti.

4) Raða skal 1,5 ml örtilraunaglösunum með lifrarsýnunum í ísstandinn í röð eftir númerum á sýnum (óþarft er að þíða lifrina).

Framkvæmd formeðhöndlunar

1) Ísetning jafningsjafnalausnarinnar

Litið er í skrána til að finna hvert rúmmál jafningsjafnalausnar tiltekins lifrarsýnis á að vera og örpípettan stillt (rúmmálssvið: 100–1 000 µl) fyrir viðeigandi rúmmál. Hreinn oddur er festur á örpípettuna.

Jafnalausnin fyrir jafninginn er tekinn úr prófefnaflöskunni og bætt í 1,5 ml örtilraunaglas sem inniheldur lifrina.

Jafnalausninni er bætt í öll 1,5 ml örtilraunaglös, sem innihalda lifur, samkvæmt verkferlinu sem lýst er hér að ofan. Ekki er þörf á að skipta oddinum á örpípettunni út fyrir nýjan. Ef oddurinn er mengaður eða ef grunur leikur á um að hann sé mengaður skal þó skipt um hann.

2) Lifrin jöfnuð

— Nýr stautur er festur á jafnara (e. *homogeniser*) fyrir örtilraunaglös.

— Stauturinn er settur í 1,5 ml örtilraunaglasið. Jafnaranum fyrir örtilraunaglasið er haldið þannig að lifrin pressist milli yfirborðsins á stautnum og innri veggjar 1,5 ml örtilraunaglassins.

— Jafnarinn fyrir örtilraunaglasið er látinn ganga í 10–20 sekúndur. Meðan á aðgerðinni stendur er 1,5 ml örtilraunaglasið kælt með ískurli.

— Stautnum er lyft upp úr 1,5 ml örtilraunaglasinu og látinn bíða í u.þ.b. 10 sekúndur. Síðan er ástand sviflausnarinnar kannað sjónrænt.

— Ef lifrarbitar sjást í sviflausninni skal endurtaka aðgerð 3) og 4) til að tilreiða fullnægjandi lifrarjafning.

— Lifrarjafningurinn í sviflausninni er kældur í ísstandinum þar til hann er skilinn í skilvindu.

— Skipt er um staut fyrir hvern jafning.

— Jafna skal allar lifrar með jafningsjafnalausn samkvæmt verkferlinu sem lýst er hér að ofan.

3) Lifrarjafningurinn í sviflausinni skilinn í skilvindu

— Staðfesta skal að hitastigið á skilvindukæliklefunum sé við ≤ 5 °C.

— Setja skal 1,5 ml örtilraunaglasið, sem inniheldur lifrarjafninginn í sviflausninni, í kæliskilvindu (aðlaga jafnvægið ef þörf krefur).

— Lifrarjafningurinn í sviflausninni er skilinn í skilvindu við 13 000 g í 10 mínútur við ≤ 5 °C. Ef lögin, sem fljóta ofan á, eru nægilega vel aðskilin er þó hægt að stilla kraft skilvindunnar og tíma eftir þörfum.

— Eftir skiljun skal kanna hvort lögin, sem fljóta ofan á, eru nægilega vel aðskilin (yfirborð: lípíð, millilag: flot, botnlag: lifrarvefur). Ef aðskilnaðurinn er ekki fullnægjandi skal skilja sviflausnina aftur við sömu skilyrði.

— Taka skal öll sýnin úr kæliskilvindunni og raða þeim í ísstandinn í röð eftir númerunum á þeim. Þess skal gætt að þyrla ekki aðskildum lögum upp aftur eftir skiljun.

4) Söfnun á flotinu

— Fjögur 0,5 ml örtilraunaglös til að geyma flotið í eru sett í tilraunaglasastandinn.

— Safnað er 30 µl af hverju floti (aðskilið sem millilagið) með örpípettu og það sett í eitt 0,5 ml örtilraunaglas. Þess skal gætt að taka hvorki af lípíðinu á yfirborðinu né lifrarvefnum í botnlaginu.

— Flotinu er safnað og það sett í næstu tvö 0,5 ml örtilraunaglös á sama hátt og lýst er hér að framan.

— Afgangnum af flotinu er safnað með örpípettunni (ef mögulegt er: ≥ 100 µl). Síðan er flotið sett í 0,5 ml örtilraunaglasið sem eftir er. Þess skal gætt að taka hvorki af lípíðinu á yfirborðinu né lifrarvefnum í botnlaginu.

— Lokinu á 0,5 ml örtilraunaglasinu er lokað og rúmmál flotsins skrifað á merkimiðann. Síðan eru örtilraunaglösin kæld samstundis í ísstandinum.

— Skipt er um odd á örpípettunni fyrir hvert flot. Ef mikið magn lípíðs festist við oddinn skal tafarlaust setja nýjan odd til að forðast að lifrarkjarninn mengist af fitu.

— Öllu flotinu, sem var skilið í skilvindu, er skipt í fjögur 0,5 ml örtilraunaglös samkvæmt verkferlinu sem lýst er hér að framan.

— Eftir að flotinu hefur verið skipt í 0,5 ml örtilraunaglösin skal setja þau öll í tilraunaglasastandinn með merkimiðanum og frysta þau síðan tafarlaust í frystinum. Ef styrkur vítellógeníns er mældur tafarlaust eftir formeðhöndlun skal halda einu 0,5 ml örtilraunaglasi (sem inniheldur 30 µl af floti) köldu í tilraunaglasastandinum og færa það yfir á vinnustöðina þar sem ELISA-prófunin er framkvæmd. Í slíku tilviki skal setja örtilraunaglösin, sem eftir eru, í tilraunaglasastandinn og frysta þau í frystinum.

— Eftir að flotinu hefur verið safnað skal leifunum fleygt eftir því sem við á.

Geymsla á sýninu

Geyma skal 0,5 ml örtilraunaglösin með flotinu af lifrarjafningnum við ≤ – 70 °C þar til þau eru notuð í ELISA-prófunina.

<u>Verkferli 3A:</u> Sebradanni, blóðsöfnun úr sporðbláæð/-slagæð

Strax eftir svæfingu er stirtlan skorin þvert í sundur og blóðið fjarlægt úr sporðslagæð/-bláæð með heparínmeðhöndlaðri hárpípu, notaðri við blóðkornaskil. Magn blóðs er á bilinu 5–15 míkrólítrar, háð stærð fisksins. Sama rúmmáli af aprótínínjafnalausn (6 míkrógrömm/ml í fosfatstilltri saltlausn) er bætt við hárpípuna, sem er notuð við blóðkornaskil, og blóðvökvinn aðskilinn frá blóðinu með skiljun (5 mínútur við 600 g). Blóðvökva er safnað í tilraunaglösin og geymdur við – 20 °C þangað til hann er greindur m.t.t. vítellógeníns eða annarra prótína sem eru til athugunar.

<u>Verkferli 3B:</u> Sebradanni, blóðsöfnun með hjartaástungu

Til að komast hjá storknun blóðs og prótínniðurbroti skal safna sýnunum í jafnalausn með fosfatstilltri saltlausn sem inniheldur heparín (1 000 einingar/ml) og prótínkljúfalatann aprótínín (2 TIU/ml). Mælt er með heparínammóníumsalti og frostþurrkuðu aprótíni sem innihaldsefni í jafnalausnina. Mælt er með sprautu (1ml) með áfastri, fínni nál (t.d. Braun Omnikan-F) til blóðsýnatöku. Sprautan skal forfyllt með jafnalausn (u.þ.b. 100 míkrólítrar) til að skola alveg út hið litla blóðmagn úr hverjum fiski. Blóðsýnin eru tekin með hjartaástungu. Fyrst skal svæfa fiskinn með MS-222 (100 mg/l). Með réttri svæfingu er notandanum kleift að greina hjartslátt sebradannans. Meðan stungið er í hjartað skal vera með vægan þrýsting á sprautustimplinum. Magn blóðs, sem hægt er að safna, er á bilinu 20–40 míkrólítrar. Eftir hjartaástunguna skal setja blóð-/jafnalausnarblönduna í tilraunaglasið. Blóðvökvinn er aðskilinn frá blóðinu með skilju (20 mínútur, 5 000 g) og skal geymdur við –80 °C þangað til þörf er á honum til greiningar.

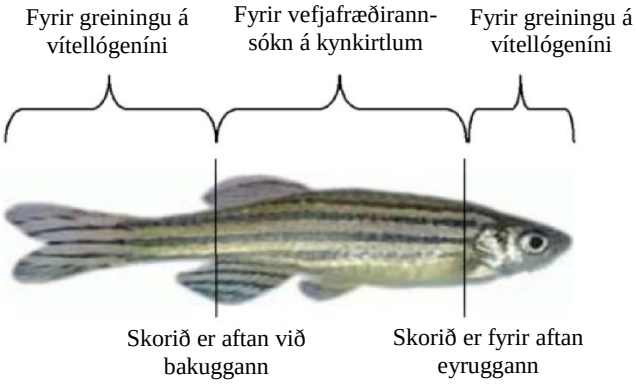
Verkferli 3C: Stöðluð verklagsregla: Sebradanni, haus & sporður jafnaðir

1. Fiskurinn er svæfður og aflífaður í samræmi við lýsingu á prófun.

2. Haus og sporður eru skornir af fiskinum í samræmi við mynd 1.

Mikilvægt: Öll krufningaráhöld og skurðarbrettið skal skola og hreinsa vandlega (t.d. með 96% etanóli) áður en hver fiskur er meðhöndlaður til að koma í veg fyrir „vítellógenínmengun“ frá hrygnum eða meðhöndluðum hængum yfir í ómeðhöndlaða hænga.

Mynd 1



3. Samanlögð þyngd hauss og sporðs af hverjum fiski er mæld að næsta mg.

4. Eftir að hlutarnir hafa verið vegnir eru þeir settir í viðeigandi tilraunaglös (t.d. 1,5 ml eppendorf) og frystir við – 80 °C þangað til þeir eru jafnaðir eða þeir eru strax jafnaðir á ís með tveimur plaststautum. (Hægt er að nota aðrar aðferðir ef þær eru gerðar á ís og útkoman er einsleitur massi). Mikilvægt: *Númera skal tilraunaglösin rétt þannig að hægt sé að tengja haus og sporð hvers fisks við bolhluta hans sem eru notaðir í vefjafræðirannsókn á kynkirtlum.*

5. Þegar einsleitur massi hefur náðst er bætt við ískaldri **jafningsjafnalausn** (*) sem nemur fjórfaldri þyngd vefjarins. Unnið er áfram með stautinn þar til blandan er jöfnuð. Mikilvæg athugasemd: *Nota skal nýjan staut fyrir hvern fisk.*

6. Sýnin eru geymd á ís fram að skiljun við **4 °C** við 50 000 g í 30 mínútur.

7. Notuð er pípetta til að setja 20 µl skammt af floti í a.m.k. tvö tilraunaglös með því að dýfa oddinum á pípettunni niður fyrir fitulagið á yfirborðinu og sjúga flotið varlega upp án fituarða eða kögglabrota.

8. Tilraunaglösin eru geymd við – 80 °C uns þau eru notuð.

———

(*) Jafnalausn fyrir jafning
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% blanda prótínkljúfalata (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl blanda prótínkljúfalata.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) t.d. frá Bie & Berntsen, Danmörku.
— Blanda prótínkljúfalata: Frá Sigma (fyrir spendýravefi), vara nr. P 8340.
ATHUGASEMD: Nota skal jafnalausnina fyrir jafninginn sama dag og hún er tilreidd. Hún er höfð á ís meðan á notkun stendur.

7. viðbætir

VÍTELLÓGENÍNSTYRKT SÝNI OG VIÐMIÐUNARSTAÐALL MILLI PRÓFANA

Hvern þann dag sem vítellógeníngreiningar eru framkvæmdar skal greina styrkingarsýni sem er gert með því að nota viðmiðunarstaðal milli prófana. Vítellógenínið, sem er notað til að gera viðmiðunarstaðal milli prófana, skal koma úr annarri framleiðslulotu en notuð er til að tilreiða kvörðunarstaðla fyrir rannsóknina sem gerð er.

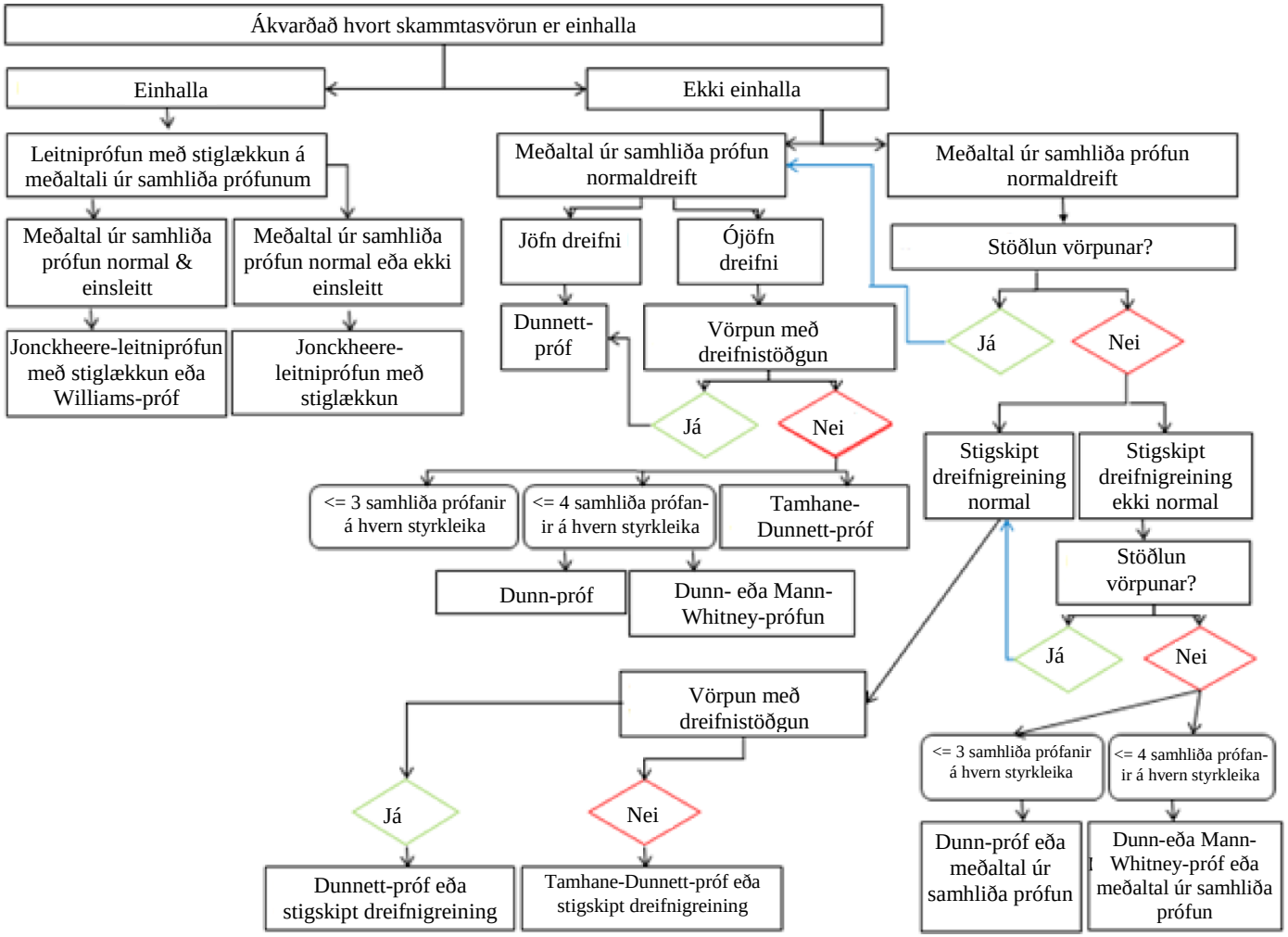
Styrkingarsýnið skal gert með því að bæta þekktu magni af prófunarviðmiðunarstaðli við sýni af blóðvökva úr samanburðarhængum. Sýnið er styrkt til að það nái vítellógenínstyrk á bilinu 10–100-földum þeim styrk vítellógeníns sem búist er við í hængum í samanburðinum. Styrkt sýni af blóðvökva úr samanburðarhængum getur verið úr einstökum fiski eða samsett úr nokkrum fiskum.

Undirsýni úr óstyrktum blóðvökva úr samanburðarhængum er greint í a.m.k. tveimur eins sýnum í bakka. Styrkta sýnið er einnig greint í a.m.k. tveimur eins sýnum í bakka. Meðaltali vítellógenínmagns í tveimur óstyrktum blóðvökvasýnum úr viðmiðunarhængum er bætt við útreiknað magn vítellógeníns sem bætt er við sýnin til að ákvarða þann styrk sem búist er við. Gera verður grein fyrir hlutfallinu milli styrks sem búist er við og mælds styrks ásamt niðurstöðum úr hverri röð greininga sem eru framkvæmdar þann dag.

———

8. viðbætir

FLÆÐIRIT TIL HJÁLPAR VIÐ ÁKVÖRÐUN Á TÖLFRÆÐILEGRI GREININGU



C.49 **Prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 236 um prófanir (2013). Þar er lýst prófun með sebradanna (*Danio rerio*) á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska. Tilgangurinn með þessari prófun er að ákvarða bráð eiturhrif íðefna á fósturvísisstig fiska. Prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska (FET) byggist á rannsóknum og fullgildingarstarfsemi sem fram fór með sebradanna (1.–14. heimild). Prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska var notuð með góðum árangri á margvísleg íðefni sem sýndu fjölbreytta verkunarhætti, leysni, rokgirni og vatnsfælni (farið yfir það í 15. og 16. lið).

2. Skilgreiningar sem eru notaðar í þessari prófunaraðferð er að finna í 1. viðbæti.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

3. Nýfrjóvguð hrogn sebradanna eru látin verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu í 96 klst. Allt að fjórar afgerandi athuganir (e. *apical observations*) eru skráðar á sólarhring, sem merki um banvæn áhrif (6. heimild): i. frjóvguð hrogn storkna, ii. frumdeild myndast ekki, iii. dausknappur losnar ekki frá kviðpokanum og iv) enginn hjartsláttur. Við lok váhrifatímabilsins eru bráð eiturhrif ákvörðuð á grundvelli jákvæðrar útkomu úr einhverri af afgerandi athugununum fjórum sem eru skráðar og LC_{50} reiknað út.

ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

4. Gagnlegar upplýsingar um efnasértæka eiginleika eru m.a. byggingarformúla, sameindaþyngd, hreinleiki, stöðugleiki í vatni og birtu, pK_a og K_{ow}, vatnsleysni og gufuþrýstingur sem og niðurstöður úr prófun á auðlífbrjótanleika (prófunaraðferð C.4 (17. heimild) eða prófunaraðferð C.29 (18. heimild)). Leysni og gufuþrýsting má nota til að reikna út fasta samkvæmt lögmáli Henrys sem sýnir hvort umtalsvert tap geti orðið á prófunaríðefninu vegna uppgufunar meðan á prófuninni stendur. Fyrir skal liggja áreiðanleg greiningaraðferð til að mæla magn efnisins í prófunarlausnunum með þekktri og skráðri nákvæmni og greiningarmörkum.

5. Ef prófunaraðferð er notuð til prófunar á blöndu skal lýsa eiginleikum samsetningar hennar, að því marki sem unnt er, t.d. með efnakenni innihaldsefna hennar, magnbundnu innihaldi og efnasértækum eiginleikum (sjá 4. lið). Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu er notuð í eftirlitsskyni skal skoða hvort hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi.

6. Að því er varðar efni sem geta virkjast með efnaskiptum eru vísbendingar um að fósturvísar sebradanna búi yfir getu til lífummyndunar (19.–22. heimild). Þó er efnaskiptageta í fósturvísum fiska ekki alltaf svipuð og hjá ungfiskum eða fullorðnum fiskum. Til dæmis vantar eiturefnisforverann (e. *protoxicant*) allýlalkóhól (9. heimild) í prófun á bráðum eiturhrifum á fósturvísa fiska. Ef einhverjar vísbendingar eru um að umbrotsefni eða önnur ummyndunarefni sem skipta máli geti verið eitraðri en móðurefnið er því einnig mælt með að framkvæma prófunina með þessum umbrotsefnum/ummyndunarefnum og einnig með því að nota þessar niðurstöður þegar dregnar eru ályktanir um eiturhrif prófunaríðefnisins eða að öðrum kosti að framkvæma aðra prófun þar sem tekið er ennþá meira mið af efnaskiptum.

7. Að því er varðar efni með sameindaþyngd ≥ 3kDa, mjög stórgerða sameindabyggingu og efni sem valda seinkun á klaki, sem gæti komið í veg fyrir eða dregið úr váhrifum eftir klak, er ekki búist við næmi fósturvísa vegna takmarkaðs lífaðgengis efnisins og aðrar eiturhrifaprófanir gætu átt betur við.

GILDI PRÓFUNARINNAR

8. Til að prófunarniðurstöður teljist gildar gilda eftirfarandi viðmiðanir:

   a) Heildarfrjóvgunarhlutfall allra hrogna sem er safnað skal vera ≥ 70% í lotunni sem er prófuð.

b) Vatnshita skal alltaf haldið við 26 ± 1 °C í prófunarkerjunum meðan prófunin stendur yfir.

c) Heildarlifun fósturvísa í neikvæðum (þynningarvatn) samanburði og, ef við á, í samanburði með leysi skal vera ≥ 90% fram til loka 96 klst. váhrifanna.

d) Váhrif frá jákvæða samanburðinum (t.d. 4,0 mg/l 3,4-díklóranilín fyrir sebradanna) skulu leiða til a.m.k. 30% dauðsfalla við lok 96 klst. váhrifanna.

e) Klakhraði í neikvæðum samanburði (og samanburði með leysi, ef við á) skal vera ≥ 80% við lok 96 klst. váhrifanna.

f) Við lok 96 klst. váhrifanna skal styrkur uppleysts súrefnis í neikvæða samanburðinum og hæsti prófunarstyrkur vera ≥ 80% af mettun.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

9. Yfirlit um ráðlagt viðhald og prófunarskilyrði er að finna í 2. viðbæti.

Búnaður

10. Eftirfarandi búnaður er nauðsynlegur:

a) Fisktankar úr efnafræðilega óvirku efni (t.d. gleri) og hæfilega stórir miðað við ráðlagt hleðsluhlutfall (sjá 14. lið, „Fiskum til undaneldis haldið við“).

b) Umhverfð smásjá og/eða tvísæissmásjá með a.m.k. 80-falda stækkunargetu. Ef ekki er hægt að aðlaga hitastig í herberginu, sem er notað til að skrá athuganir, að 26 ± 1 °C er nauðsynlegt að hafa færanlega þverbrú með hitastýringu (e. *cross movement stage*) til að viðhalda hitastigi.

c) Prófunarker, t.d. staðlaðir bakkar með 24 holum og dýpt sem nemur u.þ.b. 20 mm (sjá 11. lið, „Prófunarker“).

d) Sjálflímandi filma, til dæmis, til að hylja bakkana með 24 holum.

e) Ræktunarkassi eða loftræst herbergi með stýrðu hitastigi sem gerir kleift að viðhalda 26 ± 1 °C í holum (eða prófunarkerjum).

f) Sýrustigsmælir.

g) Súrefnismælir.

h) Búnaður til að ákvarða hörku vatns og eðlisleiðni.

i) Hrognagildra: tækjabakkar úr gleri, ryðfríu stáli eða öðru hvarftregu efni; vírnet (möskvastærð 2 ± 0,5 mm) úr ryðfríu stáli eða öðru hvarftregu efni til að verja hrognin eftir hrygningu; hrygningarundirlag (t.d. plöntueftirlíkingar úr hvarftregu efni (prófunaraðferð C.48, 4. viðbætir a (23. heimild)).

j) Pípettur með breiðu opi til að safna hrognum.

k) Glerílát til að tilreiða mismunandi prófunarstyrkleika og þynningarvatn (bikarglös, mæliflöskur, mælihólkar og kvarðaðar pípettur) eða til að safna hrognum sebradanna (t.d. bikarglös, kristöllunarskálar).

l) Ef annars konar váhrifakerfi, s.s. gegnumstreymiskerfi (24. heimild) eða hlutlaus skömmtunarkerfi (25. heimild) eru notuð við framkvæmd prófunar er þörf á viðeigandi aðstöðu og búnaði.

Prófunarker

11. Nota skal prófunarker úr gleri eða pólýstýreni (t.d. bakka með 24 holum og 2,5–5 ml fyllingargetu í hverri holu). Ef grunur leikur á um ásog á pólýstýren (t.d. að því er varðar óskautuð, slétt efni með hátt K_{OW}) skal nota hvarftreg efni (gler) til að minnka tap vegna ásogs (26. heimild). Koma skal prófunarkerjum fyrir af handahófi á prófunarsvæðinu.

Vatn og prófunarskilyrði

12. Mælt er með að þynna vatn til viðhalds til að ná því gildi hörku sem er dæmigert fyrir margs konar yfirborðsvatn. Þynningarvatn skal tilreitt úr endurgerðu vatni (27. heimild). Það stig hörku sem næst skal svara til 100–300 mg/l $CaCO_3$ til að koma í veg fyrir óhóflega útfellingu kalsíumkarbónats. Nota má annað vel skilgreint yfirborðsvatn eða brunnvatn. Hægt er að aðlaga endurgerða vatnið að vatni til viðhalds, sem er með litla hörku, með því að þynna það með afjónuðu vatni að hlutfallinu 1:5 og hörku að lágmarki 30–35 mg/l $CaCO_3$. Vatnið er loftblandað að súrefnismettun áður en prófunaríðefni er bætt í. Hitastigi skal haldið við 26 ± 1 °C í holunum í allri prófuninni. pH-gildi skal vera á bilinu 6,5–8,5 og frávik skal ekki vera meira en 1,5 einingar meðan á prófuninni stendur. Ef ekki er búist við að sýrustigið haldist á þessu bili skal stilla sýrustigið áður en prófun hefst. Sýrustigsstillinguna skal gera þannig að ekki verði marktæk breyting á styrk stofnlausnarinnar og að hún valdi engum efnahvörfum á prófunaríðefninu eða útfellingum úr því. Mælt er með því að nota vetnisklóríð (HCl) og natríumhýdroxíð (NaOH) til að leiðrétta sýrustig í lausnum sem innihalda prófunaríðefnið.

Prófunarlausnir

13. Hægt er að tilreiða prófunarlausnir með styrkleikum sem valdir hafa verið, t.d. með því að þynna stofnlausn. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnirnar með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- og/eða úthljóðsbúnaði). Ef erfitt er að leysa prófunaríðefni upp í vatni skal fylgja verkferlum sem lýst er í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar nr. 23 um meðhöndlun íðefna og blandna sem erfitt er að gera prófanir á (e. *OECD Guidance Document No. 23 for handling difficult substances and mixtures*) (28. heimild). Forðast skal notkun leysa en það kann þó að vera nauðsynlegt í tilteknum tilvikum til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika. Ef leysir er notaður sem hjálparefni þegar stofnlausn er tilreidd skal lokastyrkurinn ekki vera meiri en 100 µl/l og hann skal vera sá sami í öllum prófunarkerjum. Ef leysir er notaður er þörf á viðbótarsamanburði með leysi.

Fiskum til undaneldis haldið við

14. Undaneldisstofn af villigerð sebradanna, sem hefur ekki orðið fyrir váhrifum, með vel skjalfest frjóvgunarhlutfall hrogna er notaður til hrognaframleiðslu. Fiskar skulu lausir við einkenni sýkinga og sjúkdóma, sem hægt er að sjá með berum augum, og skulu ekki hafa gengist undir neins konar lyfjameðferð (bráða eða vegna sjúkdómsvarna) í 2 mánuði fyrir hrygningu. Undaneldisfiskum er haldið í keri með ráðlagðri hleðslugetu sem nemur 1 l af vatni á hvern fisk og fastsettri 12–16 klst. ljóslotu (29.–33. heimild). Ákjósanlegt síunarstreymi skal stillt; forðast skal óhóflegt síunarstreymi sem veldur mikilli ókyrrð í vatninu. Að því er varðar fóðrun, sjá 2. viðbæti. Forðast skal offóðrun og vakta skal vatnsgæði og hreinleika í kerinu reglulega og endurstilla í upphaflegt ástand, ef nauðsyn krefur.

Hæfnisprófun

15. Prófa skal 3,4-díklóranilín, sem viðmiðunaríðefni, (notað í fullgildingarrannsóknum (1. og 2. heimild)) á öllum sviðum styrkháðrar svörunar til að kanna næmi fiskstofnana sem eru notaðir, helst tvisvar á ári. Sérhver rannsóknarstofa, sem gerir þessa greiningu í fyrsta sinn, skal nota viðmiðunaríðefnið. Rannsóknarstofa getur notað þetta íðefni til að sýna fram á tæknilega færni sína við framkvæmd greiningarinnar áður en hún leggur inn gögn í eftirlitsskyni.

Hrognaframleiðsla

16. Sebradannar geta hrygnt í hrygningarhópum (í stökum hrygningarkerjum) eða með fjöldahrygningu (í viðhaldskerjum). Ef um er að ræða hrygningarhópa eru hængar og hrygnur (t.d. í hlutfallinu 2:1) í undaneldishóp sett í hrygningarker nokkrum klukkustundum fyrir myrkur daginn fyrir prófunina. Þar eð hrygningarhópar sebradanna hrygna ekki alltaf er mælt með samhliða notkun á a.m.k. þremur hrygningarkerjum. Til að komast hjá erfðafræðilegri bjögun er hrognunum safnað frá a.m.k. þremur undaneldishópum sem er blandað saman og valið úr af handahófi.

17. Til að safna hrognunum eru hrognagildrur settar í hrygningarkerin eða viðhaldskerin fyrir myrkur daginn fyrir prófunina eða fyrir birtingu á prófunardaginn. Til að koma í veg fyrir að fullorðnir sebradannar éti hrognin eru sett óhvarfgjörn vírnet með viðeigandi möskvastærð (u.þ.b. 2 ± 0,5 mm) yfir hrognagildrurnar. Ef það er talið nauðsynlegt er hægt að festa gerviplöntur úr óhvarftregu efni (t.d. plasti eða gleri) við netið til að örva hrygninguna (3.–5., 23. og 35. heimild). Nota skal veðrað plastefni sem útskolast ekki (t.d. þalöt). Pörun, hrygning og frjóvgun fara fram innan 30 mínútna eftir að birtir og hægt er að fjarlægja hrognagildrurnar varlega með hrognunum í. Mælt er með því að skola hrognin með endurgerðu vatni eftir að þeim er safnað úr hrognagildrunum.

Aðgreining hrogna

18. Við 26 °C skipta frjóvguð hrogn sér í fyrsta sinn eftir u.þ.b. 15 mín og samfelld, samstillt skipting myndar 4, 8, 16 og 32 kímfrumur (sjá 3. viðbæti) (35. heimild). Á þessum stigum er hægt að sanngreina frjóvguð hrogn með skýrum hætti vegna myndunar kímblöðru.

VERKFERLI

Váhrifaskilyrði

19. Tuttugu fósturvísar á hvern styrk (einn fósturvísir á hverja holu) eru látnir verða fyrir váhrifum af prófunaríðefninu. Váhrif skulu vera þannig að ± 20% af nafnstyrk íðefnis sé viðhaldið í allri prófuninni. Ef þetta er ekki mögulegt í kyrrstöðukerfi skal nota viðráðanlegt hálfkyrrstöðuendurnýjunarmillibil (t.d. endurnýjun einu sinni á sólarhring). Í þeim tilvikum þarf að staðfesta váhrifastyrkleikana, a.m.k. við hæsta og lægsta prófunarstyrkleika í upphafi og við lok hvers váhrifabils (sjá 36. lið). Ef ekki er hægt að viðhalda váhrifastyrk sem nemur ± 20% af nafnstyrk þarf að mæla alla styrkleika við upphaf og lok hvers váhrifabils (sjá 36. lið). Við endurnýjun skal þess gætt að svolítið magn af gömlum prófunarlausnum fljóti yfir fósturvísa sem eftir eru til að komast hjá þornun. Hægt er að aðlaga tilhögun prófunar til að uppfylla prófunarkröfur m.t.t. sértækra efna (t.d. gegnumstreymi (24. heimild) eða hlutlaus skömmtunarkerfi (25. heimild) fyrir efni sem brotna auðveldlega niður eða eru mjög ásogandi (29. heimild) eða annað fyrir rokgjörn efni (36. og 37. heimild)). Í öllum tilvikum skal þess gætt að lágmarka allt álag á fósturvísana. Prófunarker skulu undirbúin í a.m.k. 24 klst. með prófunarlausnunum áður en prófunin hefst. Prófunarskilyrði eru tekin saman í 2. viðbæti.

Prófunarstyrkleikar

20. Að jafnaði þarf fimm styrkleika prófunaríðefnisins með styrkbilsstuðul sem er ekki stærri en 2,2 til að uppfylla tölfræðilegar kröfur. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Æskilegt er að hæsti styrkurinn sem prófaður er leiði til 100% dauðsfalla og að lægsti styrkurinn sem prófaður er hafi ekki nein merkjanleg áhrif, eins og skilgreint er í 28. lið. Skammtastærðarannsókn fyrir endanlega prófun gerir kleift að velja viðeigandi styrkbil. Skammtastærðarannsóknin er alla jafna framkvæmd með því að nota tíu fósturvísa á hvern styrk. Eftirfarandi leiðbeiningar eiga við um framkvæmd prófunar í bakka með 24 holum. Ef annars konar prófunarker eru notuð (t.d. litlar ræktunarskálar) eða fleiri styrkleikar prófaðir þarf að aðlaga leiðbeiningarnar til samræmis við það.

21. Upplýsingar og sjónrænar leiðbeiningar um skiptingu styrkleika í bakka með 24 holum er að finna í 27. lið og mynd 1. í 4 viðbæti.

Samanburðir

22. Gerð er krafa um samanburði með þynningarvatni, bæði sem neikvæðan samanburð og innri samanburð á bökkum. Ef fleiri en einn dauður fósturvísir finnst í innri samanburði á bökkum er bakkanum hafnað og þannig fækkar styrkleikum sem eru notaðir til að leiða út LC_{50}. Ef heilum bakka er hafnað getur orðið erfiðara að meta og greina áhrif sem koma í ljós, einkum ef bakkinn, sem er hafnað, er samanburðarbakki með leysi eða bakki þar sem meðhöndlaðir fósturvísar urðu einnig fyrir áhrifum. Í fyrra tilvikinu verður að endurtaka prófunina. Í síðara tilvikinu getur tap á heilum meðferðarhóp eða -hópum vegna dauðsfalla í innri samanburði takmarkað getu til að meta áhrif og ákvarða gildi LC_{50}.

23. Jákvæður samanburður með föstum styrkleika sem nemur 4 mg/l 3,4-díklóranilíns er gerður með hverri lotu af hrognum sem er notuð til prófana.

24. Ef leysir er notaður er viðbótarhópur með 20 fósturvísum látinn verða fyrir váhrifum af leysinum í aðskildum bakka með 24 holum sem þjónar þannig hlutverki samanburðar með leysi. Til að unnt sé að líta á prófunina sem samþykkta skal sýna fram á að leysirinn hafi ekki marktæk áhrif á hrygningartíma eða lifun né heldur að hann valdi öðrum skaðlegum áhrifum á fósturvísana (sjá 8. lið c).

Upphaf váhrifa og tímalengd prófunar

25. Prófun hefst eins fljótt og unnt er eftir frjóvgun hrognanna og bundinn er endi á hana eftir váhrif í 96 klst. Fósturvísarnir skulu settir á kaf í prófunarlausnirnar áður en skiptingu kímblöðrudisksins lýkur eða, í síðasta lagi, við 16 frumu þrepið. Til að hefja váhrifin með sem minnstum töfum eru hrogn valin af handahófi, a.m.k. tvöfaldur sá fjöldi sem þarf á hvern meðferðarhóp, og sett í viðkomandi styrkleika og samanburði (t.d. í 100 ml kristöllunarskál skulu hrognin vera alveg í kafi) eigi síðar en 90 mínútum eftir frjóvgun.

26. Lífvænleg frjóvguð hrogn skulu aðskilin frá ófrjóvguðum hrognum og flutt í bakka með 24 holum sem eru formeðhöndlaðir í 24 klst og fylltir aftur með 2 ml/holu af nýtilreiddri prófunarlausn innan 180 mínútna eftir frjóvgun. Notuð er víðsjá (helst ≥ 30-föld stækkun) til að velja frjóvguð hrogn í skiptingu sem sýna engin greinileg merki um frávik við klofnun (t.d. ósamhverfu, blöðrumyndun) eða skemmdir á æðabelg. Að því er varðar söfnun hrogna og aðskilnað, sjá mynd 1 og 3 í 3. viðbæti og mynd 2 í 4. viðbæti.

Dreifing hrogna í bakka með 24 holum

27. Hrognum er dreift í holubakka samkvæmt eftirfarandi fjölda (sjá einnig mynd 1 í 4. viðbæti)

— 20 egg á einum bakka fyrir hvern prófunarstyrk,

— 20 egg sem samanburður með leysi á einum bakka (ef nauðsyn krefur),

— 20 egg sem jákvæður samanburður á einum bakka,

— 4 egg í þynningarvatni sem innri samanburður á bökkum fyrir hvern og einn af ofangreindum bökkum,

— 24 egg í þynningarvatni sem neikvæður samanburður á einum bakka.

Athuganir

28. Afgerandi athuganir, sem gerðar eru á hverjum fósturvísi sem er prófaður, taka til eftirfarandi: frumdeild myndast ekki, halinn losnar ekki frá og enginn hjartsláttur (tafla 1). Þessar athuganir eru notaðar til að ákvarða banvæn áhrif: Jákvæð útkoma úr einhverri þessara athugana merkir að sebradannafósturvísirinn er dauður. Að auki er klak skráð daglega í meðferðar- og samanburðarhópum og hefst eftir 48 klst. Athuganir eru skráðar á sólarhringsfresti fram til loka prófunarinnar.

Tafla 1

Afgerandi athuganir á bráðum eiturhrifum í fósturvísum sebradanna 24–96 klst. eftir frjóvgun

	Váhrifatími			
	24 klst	48 klst	72 klst	96 klst
Storknaðir fósturvísar	+	+	+	+
Frumdeild myndast ekki	+	+	+	+
Hali losnar ekki frá	+	+	+	+
Enginn hjartsláttur		+	+	+

29. *Storknun fósturvísis:* Storknaðir fósturvísar eru mjólkurhvítir og virðast vera dökkir í smásjánni (sjá mynd 1 í 5. viðbæti). Fjöldi storknaðra fósturvísa er ákvarðaður eftir 24, 48, 72 og 96 klst.

30. *Frumdeild myndast ekki:* Við 26 ± 1 °C hafa u.þ.b. 20 frumdeildir myndast eftir sólarhring (sjá mynd 2 í 5. viðbæti) í fósturvísi sebradanna sem þroskast eðlilega. Ósjálfráðar hreyfingar sjást hjá fósturvísi sem þroskast eðlilega (hreyfingar til hliðanna). Ósjálfráðar hreyfingar benda til þess að frumdeildir hafi myndast. Ef frumdeildir eru ekki fyrir hendi er það skráð eftir 24, 48, 72 og 96 klst. Ef frumdeildir hafa ekki myndast eftir sólarhring getur það stafað af almennri seinkun á þroska. Frumdeildir ættu að hafa þroskast í síðasta lagi eftir 48 klst. Ef ekki er litið svo á að fósturvísarnir séu dauðir.

31. *Hali losnar ekki frá:* Hjá fósturvísi sebradanna sem þroskast eðlilega sést halinn (sjá mynd 3 í 5. viðbæti) losna frá rauðunni eftir að aftari hluti fósturvísisins hefur lengst. Ef halinn losnar ekki frá er það skráð eftir 24, 48, 72 og 96 klst.

32. *Enginn hjartsláttur:* Hjá fósturvísi sebradanna, sem þroskast eðlilega, við 26 ± 1 °C sést hjartsláttur eftir 48 klst. (sjá mynd 4 í 5. viðbæti). Sýna skal sérstaka varkárni þegar þessi endapunktur er skráður því *ekki* skal skrá óreglulegan hjartslátt sem banvænan. Enn fremur er litið svo á að sjáanlegur hjartsláttur í kviðarósæð (e. *aorta abdominalis*) sé ekki banvænn. Til að skrá þennan endapunkt skal rannsaka fósturvísa, sem ekki sýna hjartslátt, undir stækkun sem nemur að lágmarki 80x í a.m.k. eina mínútu. Ef hjartsláttur er ekki fyrir hendi er það skráð eftir 48, 72 og 96 klst.

33. Klakhraði í öllum meðferðar- og samanburðarhópum skal skráður frá og með 48 klst. og gerð grein fyrir honum. Þó að klak sé ekki endapunktur sem er notaður til að reikna út LC_{50} tryggir klakið að fósturvísirinn verður fyrir váhrifum án þess að æðabelgurinn verði e.t.v. til hindrunar og sem slíkt getur það komið að gagni við túlkun gagna.

34. Nákvæmar lýsingar á eðlilegri þroskun (35. heimild) og dæmi um óeðlilega þroskun sebradannafósturvísa er að finna í 3. og 5. viðbæti.

Greiningarmælingar

35. Við upphaf og lok prófunar eru sýrustig, heildarharka og eðlisleiðni í samanburðarhóp(um) og í hæsta styrk prófunaríðefnisins mæld. Í kerfum með hálfkyrrstöðuendurnýjun skal mæla sýrustigið fyrir og eftir að vatn er endurnýjað. Styrkur uppleysts súrefnis er mældur við lok prófunar í neikvæðum samanburði og í hæsta prófunarstyrk með lífvænlegum fósturvísum, þar sem hann skal vera í samræmi við gildisviðmiðanir prófunarinnar (sjá 8. lið f). Ef áhyggjur vakna um mismunandi hitastig í bakkanum með 24 holum er hitastigið mælt í þremur ílátum sem valin eru af handahófi. Hitastig skal skráð, helst samfellt meðan prófunin stendur yfir eða a.m.k. daglega.

36. Í kyrrstöðukerfi skal styrkur prófunaríðefnisins mældur a.m.k. við mesta og minnsta prófunarstyrk en helst í öllum meðhöndlunum við upphaf og lok prófunarinnar. Í hálfkyrrstöðuprófunum (prófunum með endurnýjun), þar sem þess er vænst að styrkur prófunaríðefnis haldist innan markanna ± 20% frá nafnstyrk, er mælt með því að mesti og minnsti prófunarstyrkur verði a.m.k. greindur í nýtilreiddum lausnum og rétt áður en til endurnýjunar kemur. Ef um er að ræða prófanir þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunaríðefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk skal greina alla prófunarstyrkleika í nýtilreiddum lausnum og rétt áður en til endurnýjunar kemur. Ef rúmmál er ekki fullnægjandi til greiningar getur verið gagnlegt að blanda saman prófunarlausnum eða nota staðgengilsker úr sama efni og með sama hlutfall milli rúmmáls og yfirborðsflatar og bakki með 24 holum. Eindregið er mælt með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef styrkleikar haldast ekki innan 80–120% af nafnstyrk skal gefa hrifstyrkina upp í hlutfalli við faldmeðaltal mældra styrkleika; sjá nánari upplýsingar í 5. kafla í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófanir í vatni á eiturhrifum íðefna og blandna, sem erfitt er að gera prófanir á (e. *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*).

MARKPRÓFUN

37. Með verkferlinu sem lýst er í þessari prófunaraðferð má gera markprófun með 100 mg/l af prófunaríðefninu, eða við leysnimörk þess í prófunarmiðlinum (hvort sem er lægra), til að sýna fram á að LC_{50} sé hærri en sá styrkur. Markprófunina skal framkvæma með 20 fósturvísum í meðhöndluninni, jákvæða samanburðinum og, ef nauðsyn krefur, í samanburðinum með leysinum, og með 24 fósturvísum í neikvæða samanburðinum. Ef hundraðshluti dauðsfalla við styrkinn sem er prófaður fer meira en 10% yfir dánartíðni í neikvæða samanburðinum (eða samanburði með leysi) skal framkvæma fullnaðarrannsókn. Skrá skal öll sýnileg áhrif. Ef dauðsföll fara yfir 10% í neikvæða samanburðinum (eða samanburði með leysi) verður prófunin ógild og skal endurtekin.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Úrvinnsla niðurstaðna

38. Í þessari prófun er litið á einstakar holur sem sjálfstæðar samhliða prófanir fyrir tölfræðilega greiningu. Hundraðshluti fósturvísa þar sem a.m.k. ein afgerandi athugun er jákvæð við 48 og/eða 96 klst. er teiknaður upp á móti prófunarstyrkleikum. Til að reikna út hallatölur ferilsins, LC_{50}-gildi og öryggismörk (95%) skal nota viðeigandi tölfræðiaðferðir (38. heimild) og styðjast við leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar um gildandi nálganir við tölfræðilega greiningu gagna um visteiturhrif (e. *OECD Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*) (39. heimild).

Prófunarskýrsla

39. Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunaríðefni:

Efni með einum efnisþætti

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv., (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis, ef við á).

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Prófunarlífverur:

— vísindaheiti, stofn, uppruni frjóvguðu hrognanna og aðferð við að afla þeirra og meðhöndlun eftir það.

Prófunarskilyrði:

— prófunaraðferð sem er notuð (t.d. hálfkyrrstöðuprófun með endurnýjun),

— ljóslota,

— tilhögun prófunar (t.d. fjöldi prófunarkerja, tegundir samanburða),

— eiginleikar sem varða vatnsgæði í viðhaldskerjum fiska (t.d. sýrustig, harka, hitastig, eðlisleiðni, uppleyst súrefni),

— styrkur uppleysts súrefnis, sýrustig, heildarharka, hitastig og eðlisleiðni prófunarlausna við upphaf og eftir 96 klst.,

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og prófunarlausna sem og tíðni endurnýjunar,

— rökstuðningur fyrir notkun leysis og rökstuðningur fyrir vali á leysi, ef annar en vatn,

— nafnstyrkleikar í prófuninni og niðurstöður úr öllum greiningum til að ákvarða styrk prófunaríðefnisins í prófunarílátunum; einnig skal greina frá endurheimtargetu aðferðarinnar og magngreiningarmörkum,

— sannanir fyrir því að samanburðir uppfylli gildisviðmiðanir fyrir heildarlifun,

— frjóvgunarhlutfall hrogna,

— klakhraði í meðferðar- og samanburðarhópum.

Niðurstöður:

— hámarksstyrkur sem veldur engum dauðsföllum meðan á prófuninni stendur,

— lægsti styrkur sem veldur 100% dauðsföllum meðan á prófuninni stendur,

— uppsöfnuð dauðsföll fyrir hvern styrk á ráðlögðum athugunartímum,

— LC_{50}-gildi við 96 klst. (og valkvætt við 48 klst.) fyrir dauðsföll með 95% öryggismörkum, ef unnt er,

— línurit sem sýnir feril styrks-dauðsfalla við lok prófunar,

— dauðsföll í samanburðum (neikvæðir samanburðir, innri samanburður á bökkum sem og jákvæður samanburður og hvers konar samanburður með leysi sem er notaður),

— gögn um niðurstöður fyrir hverja af afgerandi athugununum fjórum fyrir sig,

— nýgengi og lýsing á formfræðilegum og lífeðlisfræðilegum afbrigðileika, ef einhver er (sjá dæmi sem eru gefin í mynd 2 í 5. viðbæti),

— atvik meðan prófun stendur yfir sem gæti hafa haft áhrif á niðurstöðurnar,

— tölfræðileg greining og meðhöndlun gagna (probit-greining, tvíkosta aðhvarfslíkan og faldmeðaltal fyrir LC_{50}),

— hallatala og öryggismörk fyrir aðhvarf (umbreytts) ferils styrkháðrar svörunar.

Öll frávik frá prófunaraðferðinni og viðeigandi skýringar.

Umræða og túlkun niðurstaðna.

HEIMILDIR

1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N*,*N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N*,*N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N*,*N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783. .

16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

17) Kafli C.4 í þessum viðauka: Auðlífbrjótanleiki.

18) Kafli C.29 í þessum viðauka: Auðlífbrjótanleiki — koltvísýringur í lokuðum ílátum.

19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

23) Kafli C.48 í þessum viðauka: Skammtíma æxlunarrannsókn á fiskum. Sjá 4. viðbæti a.

24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Aðgengilegt á: [http://www.iso.org].

28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

32) European Commission (2007) Commission recommendation 2007/526/EC of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

33) Evrópusambandið (2010), Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2010/63/ESB frá 22. september 2010 um vernd dýra sem eru notuð í vísindaskyni (Stjtíð. ESB L 276, 20.10.2010, bls. 33).

34) http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

35) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

36) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

37) Kafli C.2 í þessum viðauka: Daphnia sp. Prófun á bráðri sviptingu á hreyfigetu.

38) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

39) ISO (2006) International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Aðgengilegt á: [http://www.iso.org].

40) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

41) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

———

Appendix 1

SKILGREININGAR

Afgerandi endapunktur: Veldur áhrifum á stofninn.

Kímblaðra: Frumublaðra umhverfis kímskautið (e. *animal pole*) sem hylur tiltekinn hluta rauðunnar.

Íðefni: Efni eða blanda.

Yfirvarp: ör fjölgun frumna, aðallega húðþekjufrumna, í holfóstursmyndunarfasa fósturvísisins og færsla þeirra frumna frá baklægu að kviðlægu hliðinni en þá eru innlagsfrumulögin (e. *entodermal cell layers*), sem eru innfelld með innhverfingarferli (e. *invagination-like process*), og rauðan felld inn í fósturvísinn.

Gegnumstreymisprófun: Prófun með samfelldu streymi prófunarlausna gegnum prófunarkerfið meðan váhrif standa yfir.

Innri samanburður á bökkum: Innri samanburður, sem samanstendur af 4 holum í hverjum bakka með 24 holum sem eru fylltar með þynningarvatni, til að greina hugsanlega mengun í bökkunum af völdum framleiðanda eða af völdum rannsakanda meðan verkferlið stendur yfir og öll áhrif frá bakkanum sem getur hugsanlega haft áhrif á niðurstöðu prófunar (t.d. hitastigull).

IUPAC: Alþjóðasamtök um hreina og hagnýta efnafræði.

Vatn til viðhalds: Vatn sem fullorðnum fiskum er haldið í.

Miðgildisbanastyrkur (LC_{50}): Styrkur prófunaríðefnis sem talinn er banvænn fyrir 50% prófunarlífveranna meðan prófunin stendur yfir.

Hálfkyrrstöðuprófun með endurnýjun: Prófun með reglulegri endurnýjun prófunarlausna eftir skilgreind tímabil (t.d. á sólarhringsfresti).

SMILES: einfaldað textatáknkerfi sameindabyggingar (e. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Frumdeild: Í fósturvísi hryggdýra, sem er að þroskast, eru frumdeildir massi miðlægs vefjalags í fóstrinu sem skipa sér hliðlægt við taugapípuna, sem þroskast að lokum í leðurhúð (húðgeiri), beinagrindarvöðva (vöðvageiri) og hryggjarliði (harðgeiri).

Kyrrstöðuprófun: Prófun þar sem prófunarlausnir haldast óbreyttar í gegnum alla prófunina.

Prófunaríðefni: Sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

UVCB-efni: Efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókin myndefni eða líffræðileg efni.

———

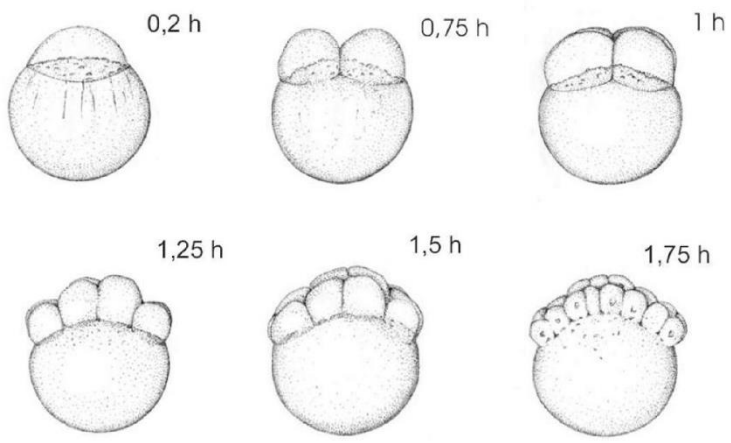
2. viðbætir

VIÐHALD, UNDANELDI OG DÆMIGERÐ SKILYRÐI FYRIR PRÓFANIR Á BRÁÐUM EITURHRIFUM Á FÓSTURVÍSA SEBRADANNA

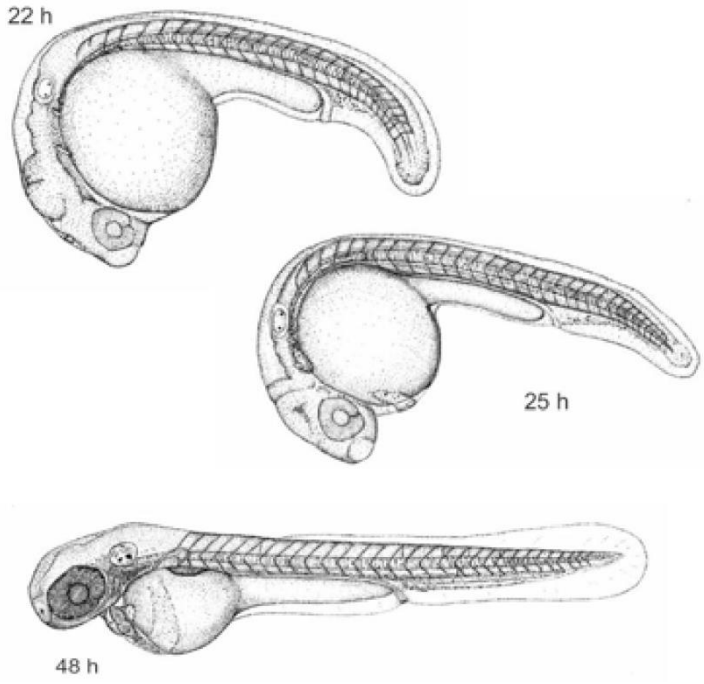
Sebradanni (*Danio rerio*)		
Uppruni tegunda		Indland, Búrma, Malakka, Súmatra
Kynbundin tvíbreytni		Hrygnur: framstæður kviður þegar þær bera hrogn Hængar: mjórri, appelsínugul litbrigði milli blárra langranda (einkum áberandi við raufaruggann)
Fóðrunarfyrirkomulag		Þurrfóður í flögum (mest 3% af þyngd fisks á dag) 3–5 sinnum á dag; að auki saltvatnsrækjur (*Artemia* tegundir), krabbalirfur og/eða litlar halaflær af viðeigandi stærð sem fengnar eru úr ómengaðri uppsprettu. Fóðrun með lifandi fóðri er uppspretta umhverfislegrar auðgunar og þess vegna skal gefa lifandi fóður þegar unnt er. Til að tryggja bestu vatnsgæði skal fjarlægja umframfóður og saur u.þ.b. klukkustund eftir fóðrun.
Áætluð þyngd fullorðins fisks		Hrygnur: 0,65 ± 0,13 g Hængar: 0,5 ± 0,1 g
Klakfiski haldið við	Lýsing	Flúrperur (breitt róf) 10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 lúx eða 50–100 ft-c (í rannsóknarstofuumhverfinu); 12–16 klst ljóslota
	Vatnshitastig	26 ± 1 °C
	Vatnsgæði	$O_2 \geq 80\%$ mettun, harka: t.d. ~30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ og NO_2^-: < 0,001 mg/l, klórleifar < 10 µg/l, heildarmagn lífræns klórs < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Frekari viðmiðanir fyrir vatnsgæði	Efnisagnir < 20 mg/l, heildarmagn lífræns kolefnis < 2 mg/l, heildarmagn varnarefna sem eru lífræn fosfórsambönd < 50 ng/l, heildarmagn klórlífrænna varnarefna auk fjölklóraðra bífenýla < 50 ng/l
	Stærð tanks til viðhalds	T.d. 180 l, 1 fiskur/l
	Vatnshreinsun	Varanleg (viðarkolasíað); aðrir möguleikar eru m.a. sambland með hálfkyrrstöðu-endurnýjunarviðhaldi eða gegnumstreymiskerfi með samfelldri endurnýjun vatns
	Ráðlags hlutfall hænga og hrygna til undaneldis	2:1 (eða fjöldahrygning)
Hrygningarker		T.d. 4 l ker búin stálgrindabotni og plöntueftirlíkingu til að örva hrygninguna; ytri hitunarmottur eða hóphrygning í viðhaldskerjunum
Uppbygging og útlit hrognanna		Stöðugur æðabelgur (*þ.e.* mjög gagnsær, óklístraður, þvermál ~ 0,8–1,5 mm)
Hrygningarhraði		Ein fullvaxin hrygna hrygnir a.m.k. 50–80 hrognum á dag. Hrygningarhraði getur verið töluvert meiri, með hliðsjón af stofninum. Frjóvgunarhlutfall skal vera ≥ 70%. Að því er varðar fiska sem hrygna í fyrsta sinn getur frjóvgunarhlutfall hrognanna verið lægra í nokkur fyrstu skiptin.
Tegund prófunar		Kyrrstaða, hálfkyrrstöðuendurnýjun, gegnumstreymi 26 ± 1 °C, 24 klst., formeðhöndluð prófunarker (t.d. bakkar með 24 holum, 2,5-5 ml í hverja holu)

3. viðbætir

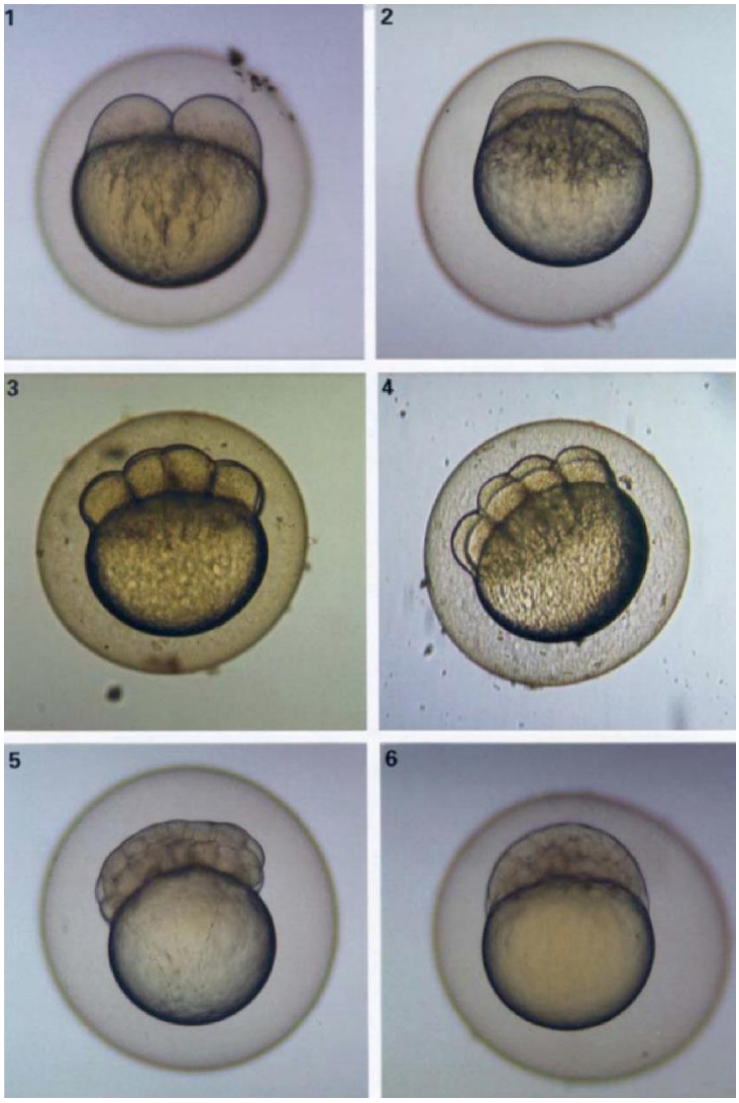
EÐLILEG ÞROSKUN SEBRADANNA VIÐ 26 °C



Mynd 1: Valin stig snemma í þroskun sebradanna (*Danio rerio*): 0,2–1,75 klst. eftir frjóvgun (úr Kimmel et al., 1995 (35. heimild)). Hægt er að nota tímaröð við eðlilega þroskun til að greina bæði frjóvgun og lífvænleika hrogna (sjá 26. lið: Val á frjóvguðum hrognum).



Mynd 2: Valin stig seint í þroskun sebradanna (*Danio rerio*) (fósturvísir sem æðabelgur hefur verið fjarlægður úr til að hámarka sýnileika): 22–48 klst. eftir frjóvgun (úr Kimmel et al., 1995 (35. heimild)).

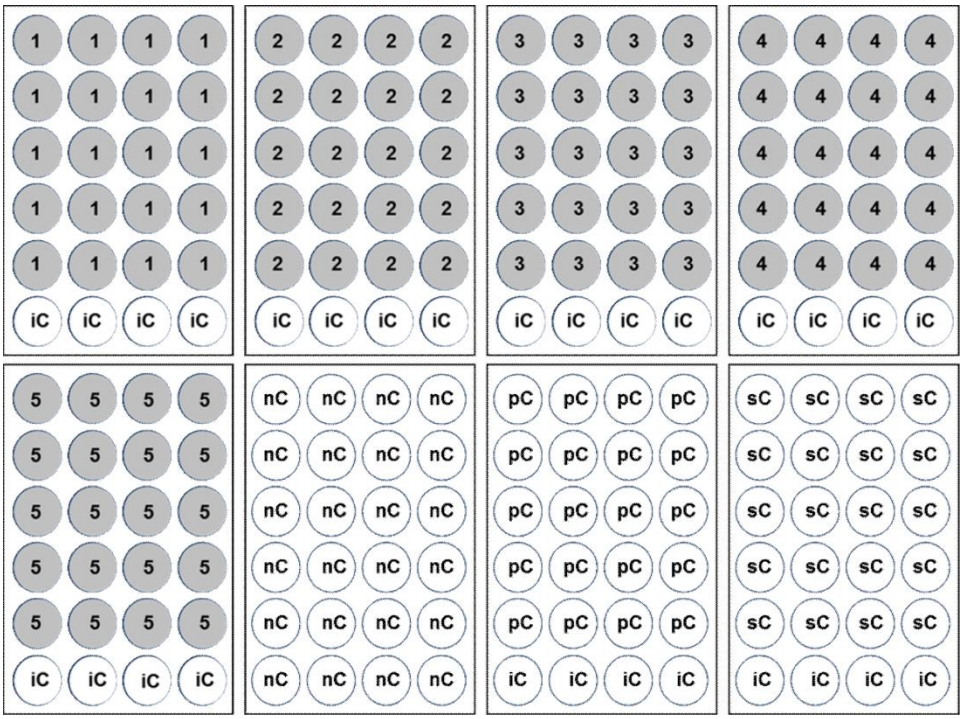


Mynd 3: Eðlileg þroskun fósturvísa sebradanna (*Danio rerio*): 1) 0,75 klst., 2-frumu stig; 2) 1 klst., 4-frumu stig; 3) 1,2 klst., 8-frumu stig; 4) 1,5 klst., 16-frumu stig; 5) 4,7 klst., yfirvarp hefst; (6) 5,3 klst., u.þ.b. 50% yfirvarp (úr Braunbeck & Lammer 2006 (40. heimild)).

4. viðbætir

Mynd 1

Uppsetning bakka með 24 holum



1–5 = fimm prófunarstyrkleikar/íðefni

nC = neikvæður samanburður (þynningarvatn)

iC = innri samanburður á bökkum (þynningarvatn)

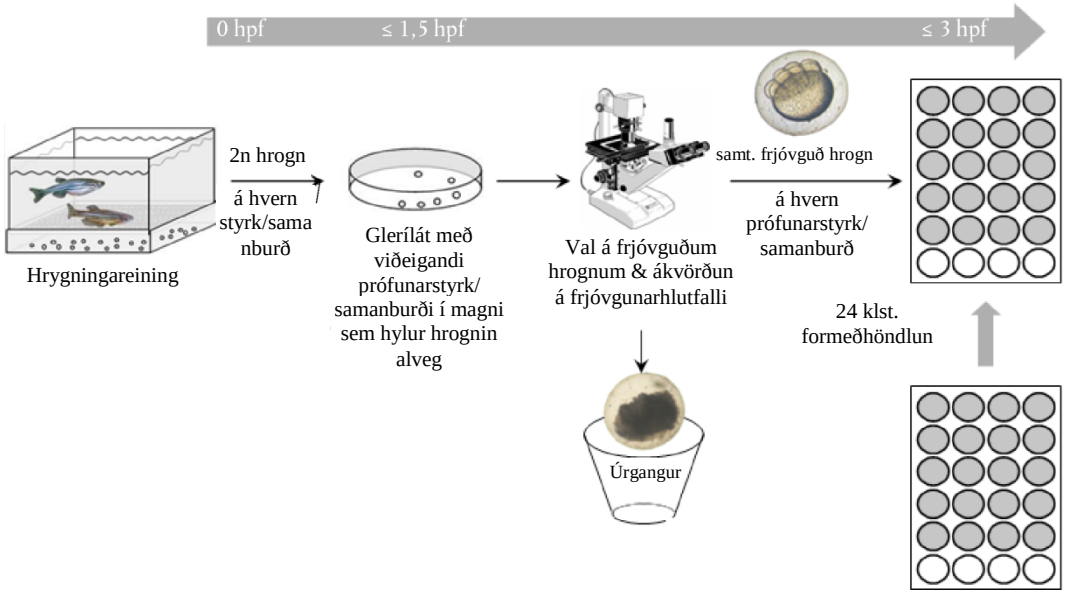
pC = jákvæður samanburður (3,4-DCA 4 mg/l)

sC = samanburður með leysi

———

Mynd 2

Yfirlit yfir verkferli prófana á bráðum eiturhrifum á fósturvísa sebradanna (frá vinstri til hægri): framleiðsla hrogna, söfnun hrogna, forváhrif í glerílátum strax eftir frjóvgun, val á frjóvguðum hrognum með umhverfðri smásjá eða tvísæissmásjá og dreifing frjóvgaðra hrogna í bakka með 24 holum sem hafa verið tilreiddir með viðeigandi prófunarstyrkleikum/samanburði, n = fjöldi hrogna sem þarf fyrir hvern prófunarstyrk/samanburð (hér 20), hpf = klst. eftir frjóvgun.



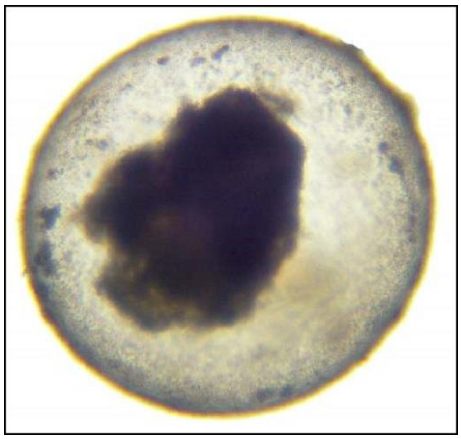
5. viðbætir

YFIRLIT YFIR BANVÆNA ENDAPUNKTA Í PRÓFUNUM Á BRÁÐUM EITURHRIFUM Á FÓSTURVÍSA SEBRADANNA

Eftirfarandi afgerandi endapunktar benda til bráðra eiturhrifa og þ.a.l. dauða fósturvísanna: *fósturvísir storknar, sporður losnar ekki frá, frumdeild myndast ekki og enginn hjartsláttur.* Eftirfarandi smásjármyndir voru valdar til að sýna þessa endapunkta.

Mynd 1

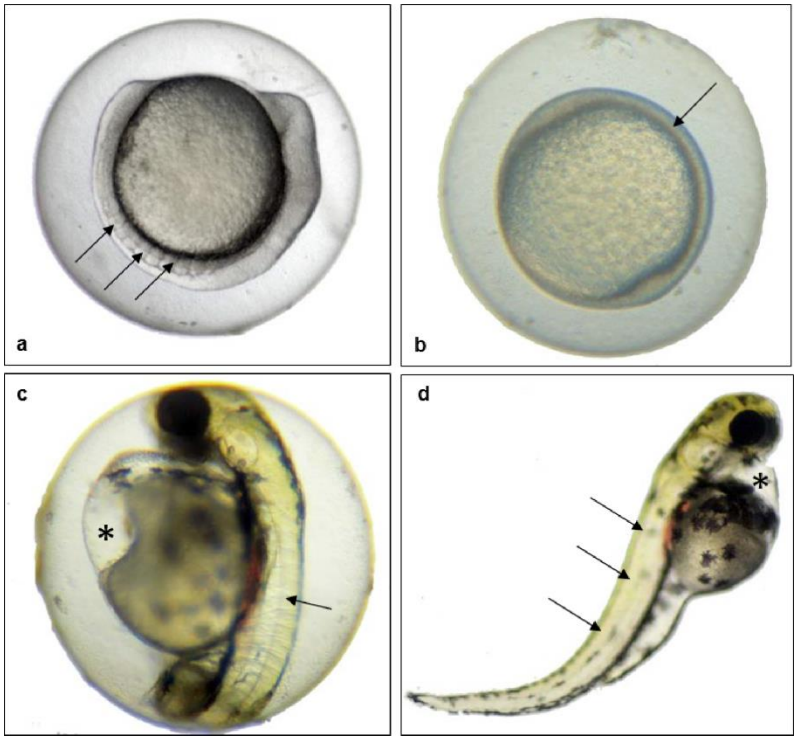
Storknun fósturvísis:



Storknaðir fósturvísar sebradanna sýna margs konar ógagnsæjar innlyksur.

Mynd 2

Frumdeild myndast ekki:



Þó að þroskun hafi seinkað um u.þ.b. 10 klst. sýnir sólarhringsgamall fósturvísir sebradanna í a) vel þroskaðar frumdeildir (→), en fósturvísir í b) sýnir engin merki um myndun frumdeildar. Þó að kviðpokinn sýni greinileg merki um bjúg (*) sýnir 48 klst. gamall fósturvísir sebradanna í c) greinilega myndun frumdeilda (→), en 96 klst. gamall fósturvísir sebradanna sem er sýndur í d) sýnir engin merki um myndun frumdeildar (→). Takið einnig eftir sveigju hryggsúlunnar (hryggskekkja) og bjúg í gollurshúsi (*) fósturvísisins á mynd d).

Mynd 3

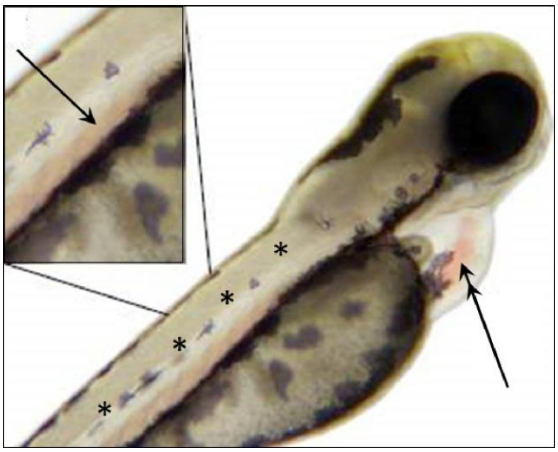
Dausknappur losnar ekki frá,



séð frá hlið (a: →; 96 klst. gamall fósturvísir sebradanna). Takið einnig eftir að augnknapp (e. *eye bud*) vantar (*).

Mynd 4

Enginn hjartsláttur



Eðli málsins samkvæmt er erfitt að sýna á smásjármynd að hjartsláttur sé ekki fyrir hendi. Það að hjartsláttur sé ekki fyrir hendi er sýnt með því að enginn samdráttur sé í hjartanu (tvöföld ör). Hreyfingarleysi blóðkorna í t.d. kviðarósæð (→ í innskoti) er ekki mælikvarði á að hjartsláttur sé ekki fyrir hendi. Takið einnig eftir að frumdeild hefur ekki myndast í þessum fósturvísi (* vöðvavefur virðist einsleitur frekar en liðskiptur). Athugunartími til að skrá að hjartsláttur sé ekki fyrir hendi skal vera a.m.k. ein mínúta með stækkun að lágmarki 80×.

———

C.50 **Eiturhrifaprófun á *Myriophyllum spicatum* án sets**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 238 um prófanir (2014). Hún er ætluð til að meta eiturhrif íðefna á *Myriophyllum spicatum*, tvíkímblöðung sem er í kafi, tegund af maraættinni. Hún byggir á fyrirliggjandi ASTM-prófunaraðferð (1. heimild) sem er breytt í prófunarkerfi án sets (2. heimild) til að meta eðlislæg visteiturhrif prófunaríðefna (óháð dreifingarhegðun prófunaríðefnis milli vatns og sets). Prófunarkerfi án sets er ekki mjög flókið í greiningu (einungis í vatnsfasa) og hægt er að greina niðurstöðurnar hliðstætt og/eða bera þær saman við niðurstöður sem fást í prófun með *Lemna sp.* (3. heimild); að auki gera dauðhreinsaðar aðstæður, sem krafist er, það kleift að halda áhrifum frá örverum og þörungum eins litlum og hægt er. Þessi prófun kemur ekki í staðinn fyrir aðrar eiturhrifaprófanir í vatni; hún ætti fremur að koma þeim til viðbótar svo unnt sé að gera ítarlegra hættu- og áhættumat á vatnaplöntum. Prófunaraðferðin hefur verið fullgilt með hringprófun (4. heimild).

2. Gefnar eru upplýsingar um prófun með endurnýjun prófunarlausnarinnar (hálfkyrrstaða) og án endurnýjunar hennar (kyrrstaða). Með hliðsjón af markmiðum prófunarinnar og krafna samkvæmt reglum er mælt með notkun hálfkyrrstöðuaðferðar, t.d. fyrir efni sem glatast hratt úr lausn vegna uppgufunar, ásogs, ljóssundrunar, vatnsrofs, útfellingar eða lífniðurbrots. Frekari leiðbeiningar eru gefnar í 5. heimild. Þessi prófunaraðferð hentar fyrir efni sem búið er að fullgilda prófunaraðferðina fyrir (sjá upplýsingar í hringprófunarskýrslunni (4. heimild)) eða fyrir samsetningar eða þekktar blöndur; ef blanda er prófuð ættu efnisþættir hennar að vera sanngreindir og magn þeirra ákvarðað eins og kostur er. Prófunaraðferðin án sets með *Myriophyllum spicatum* kemur til viðbótar við eiturhrifaprófunina á *Myriophyllum spicatum* í vatni og seti (6. heimild). Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

3. Plönturæktir af tegundinni *Myriophyllum spicatum*, sem vaxa stöðugt, (einungis í breyttum Andrews-miðli, sjá 2. viðbæti) fá að vaxa sem einræktir í mismunandi styrkleikum prófunaríðefnis í 14 daga í prófunarkerfi án sets. Markmið prófunarinnar er að magngreina áhrif af íðefnum á vöxt plantnanna á tímabilinu á grundvelli mats á völdum mælibreytum. Mælibreytur eru vöxtur sprota á lengdina, hliðargreina og róta sem og framvinda í vot- og þurrvigt og fjölgun sveipa. Auk þess er tekið tillit til greinilegra, eigindlegra breytinga á prófunarlífverunum, t.d. afmyndunar eða gulnunar og dreps sem sést á gulnun eða hvítum og brúnum litum. Til að magngreina áhrifin af íðefnum er vöxtur í prófunarlausnunum borinn saman við vöxt í samanburðarprófunum og styrkurinn, sem þarf til að valda tiltekinni x% vaxtarhindrun, er ákvarðaður og gefinn upp sem EC_x; „x“ getur verið hvaða gildi sem er, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, t.d. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Tekið skal mið af því að mat á gildi EC_{10} and EC_{20} er einungis áreiðanlegt og viðeigandi í prófunum þar sem frávikssstuðlar í samanburðarplöntum lenda undir því áhrifagildi sem verið er að meta, þ.e. frávikssstuðlar skulu vera < 20% fyrir traust mat á EC_{20}.

4. Ákvarða skal bæði meðaltal sértæks vaxtarhraða (áætlað út frá mati á lengd aðalsprotans og þremur viðbótarmælibreytum) og afrakstur (metinn út frá aukningu á lengd aðalsprotans og þremur viðbótarmælibreytum) meðhöndlaðra og ómeðhöndlaðra plantna. Sértækur vaxtarhraði (r) og afrakstur (y) eru síðan notaðir til að ákvarða E_rC_x (t.d. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) og E_yC_x (t.d. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}), eftir því sem við á.

5. Auk þess má ákvarða tölfræðilega minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

6. Greiningaraðferð með nægilegu næmi til að magnákvarða prófunaríðefnið í prófunarmiðlinum þarf að vera fyrirliggjandi. Upplýsingar um prófunaríðefnið, sem geta verið gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki og óhreinindi, vatnsleysni, stöðugleiki í vatni og ljósi, klofnunarfasti sýru (pK_a), deilistuðull oktanóls og vatns (K_{ow}), gufuþrýstingur og lífbrjótanleiki. Vatnsleysni og gufuþrýsting má nota til að reikna út fasta samkvæmt lögmáli Henrys en hann sýnir líkindin á umtalsverðu tapi prófunaríðefnisins meðan á prófuninni stendur. Þetta gefur til kynna hvort gera skal tilteknar ráðstafanir til að takmarka það tap. Ef upplýsingar um leysni og stöðugleika prófunaríðefnisins eru óljósar er mælt með því að leysni og stöðugleiki séu metin við prófunarskilyrði, þ.e. vaxtarmiðill, hitastig og lýsingarskilyrði sem verða í prófuninni.

7. Það er sérstaklega mikilvægt að stjórna sýrustigi prófunarmiðilsins, t.d. við prófanir á málmum eða efnum sem eru óstöðug fyrir vatnsrofi. Frekari leiðbeiningar um prófun á íðefnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina er að finna í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar í 5. heimild.

GILDI PRÓFUNARINNAR

8. Til þess að prófunin sé gild verður lengd aðalsprotans í samanburðinum að hafa tvöfaldast á innan við 14 dögum. Hægt er að ná þeirri viðmiðun í kyrrstöðu- eða hálfkyrrstöðuprófun með því að nota miðilinn og prófunarskilyrðin sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

9. Meðalgildi fráviksstuðuls fyrir afrakstur, sem byggist á mælingum á votvigt sprota (þ.e. frá upphafi prófunar til loka hennar) og viðbótarmælibreytunum (sjá 37. lið) í samanburðarræktunum, fer ekki yfir 35% milli samhliða prófana.

10. Yfir 50% af samhliða kerjum í samanburðarhópnum er haldið dauðhreinsuðum á 14 daga váhrifatímabilinu, sem þýðir að þau séu sýnilega laus við mengun af öðrum lífverum s.s. þörungum, sveppum og bakteríum (tær lausn). Athugasemd: Leiðbeiningar um hvernig á að meta dauðhreinsun er að finna í hringprófunarskýrslunni (4. heimild).

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

11. Gera má prófun með viðmiðunaríðefni eða -íðefnum, s.s. 3,5-díklórfenóli sem er notað í hringprófuninni (4. heimild), til eftirlits með prófunarferlinu; samkvæmt gögnum úr hringprófuninni er meðaltal EC_{50}-gilda 3,5-díklórfenóls fyrir mismunandi svarbreytur (sjá 37.–41. lið í þessari prófunaraðferð) á bilinu 3,2 mg/l til 6,9 mg/l (sjá upplýsingar um öryggisbil fyrir þessi gildi í hringprófunarskýrslunni). Mælt er með því að prófa viðmiðunaríðefni a.m.k. tvisvar á ári eða, ef prófanir eru gerðar sjaldnar, samhliða ákvörðun á eiturhrifum prófunaríðefnis.

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Búnaður

12. Öll tæki sem komast í snertingu við prófunarmiðilinn skulu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Glerbúnað, sem notaður er fyrir ræktun og prófun, skal hreinsa af mengandi íðefnum sem gætu lekið út í prófunarmiðilinn og á hann að vera dauðhreinsaður. Prófunarkerin skulu vera nógu löng til þess að sprotarnir í samanburðarkerjunum geti vaxið í vatnsfasanum án þess að ná upp í yfirborð prófunarmiðilsins við lok prófunarinnar. Mælt er með tilraunaglösum úr bórsílíkatgleri með þykkum veggjum, án brúna, innra þvermál u.þ.b. 20 mm, lengd u.þ.b. 250 mm, með álhettum.

13. Þar eð breyttur Andrews-miðill inniheldur súkrósa (sem örvar vöxt sveppa og baktería) verður að tilreiða prófunarlausnirnar við dauðhreinsaðar aðstæður. Allir vökvar, sem og búnaður, eru dauðhreinsuð fyrir notkun. Dauðhreinsun fer fram með meðhöndlun með hituðu lofti (210 °C) í 4 klst. eða gufusæfingu í 20 mínútur við 121 °C. Auk þess fá allar flöskur, diskar, skálar o.s.frv. og annar búnaður logameðhöndlun (e. *flame treatment*) á dauðhreinsuðu vinnuborði rétt fyrir notkun.

14. Ekki skal geyma ræktirnar og prófunarkerin saman. Þess vegna er best er að nota aðskilda vaxtarklefa, ræktunarkassa eða herbergi, með umhverfisstillingum. Unnt skal að stjórna lýsingu og hitastigi og halda stöðugu.

Prófunarlífvera

15. *Myriophyllum spicatum* — tvíkímblöðungur sem er í kafi — er tegund af maraætt. Á bilinu júní til ágúst standa lítt áberandi bleik-hvít blóm upp úr vatnsyfirborðinu. Rætur plantnanna eru kerfi traustra jarðstöngla og þær er hægt að finna í vötnum á öllu norðurhveli jarðar í næringarríkum en þó ómenguðum og kalsítríkum lygnum vötnum með gruggugu undirlagi. *Myriophyllum spicatum* kýs ferskvatn en finnst einnig í ísöltu vatni.

16. Eiturhrifaprófun án sets útheimtir dauðhreinsaðar plöntur. Ef prófunarstofan á ekki venjulegar ræktanir af *Myriophyllum spicatum* er hægt að fá dauðhreinsað plöntuefni frá annarri rannsóknarstofu eða hægt að taka (ódauðhreinsað) plöntuefni úr náttúrunni eða fá það frá utanaðkomandi birgi; ef plönturnar koma úr náttúrunni skal gera ráð fyrir flokkunarfræðilegri sannprófun á tegundinni. Ef plönturnar eru teknar úr náttúrunni eða koma frá utanaðkomandi birgi skal dauðhreinsa þær (1. heimild) og rækta þær í sama miðli og notaður verður við prófunina í a.m.k. átta vikur fyrir notkun. Þau náttúrusvæði sem stofnræktir eru teknar af verða að vera laus við augljósar mengunaruppsprettur. Þess skal sérstaklega gætt að tryggja að rétt tegund fáist þegar *Myriophyllum spicatum* er tekinn úr náttúrunni, einkum á svæðum þar sem hann getur blandast öðrum *Myriophyllum*-tegundum. Ef plönturnar eru fengnar frá annarri rannsóknarstofu skal rækta þær á sama hátt í a.m.k. þrjár vikur. Uppruni plantnanna og tegundanna, sem notuð eru til prófunarinnar, skal alltaf tiltekinn.

17. Gæði og einsleitni plantnanna, sem notaðar eru í prófuninni, hafa veruleg áhrif á niðurstöður prófunarinnar og því ætti að velja þær af kostgæfni. Nota skal ungar plöntur sem vaxa hratt og eru án sýnilegra vefjaskemmda eða óeðlilegs litar (gulnunar). Upplýsingar um undirbúning prófunarlífverunnar eru gefnar í 4. viðbæti.

Ræktun

18. Til að draga úr vinnu við viðhald rækta (t.d. á tímabilum þegar ekki er ráðgert að gera prófanir á *Myriophyllum*) er hægt að hafa ræktirnar við minnkaða birtu og lægra hitastig (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Upplýsingar um ræktun eru gefnar í 3. viðbæti.

19. Nægilegur fjöldi prófunarlífvera er færður með smitgát í nýjan, dauðhreinsaðan miðil, a.m.k. 14–21 degi fyrir prófunina, og ræktaðar sem forræktir í 14–21 dag við prófunarskilyrðin. Upplýsingar um undirbúning forræktar eru gefnar í 4. viðbæti.

Prófunarmiðill

20. Einungis er mælt með einum næringarmiðli fyrir *Myriophyllum spicatum* í prófunarkerfi án sets, eins og lýst er í 2. viðbæti. Mælt er með breytingu á Andrews-miðlinum til ræktunar og prófana með *Myriophyllum spicatum* eins og lýst er í 1. heimild. Breyttur Andrews-miðill fæst úr fimm stofnlausnum næringarefna, sem eru tilreiddar hver fyrir sig, með viðbættum 3% súkrósa. Upplýsingar um tilreiðslu miðilsins eru gefnar í 2. viðbæti.

21. Nota þarf breyttan Andrews-miðil af tíföldum styrk til að fá prófunarlausnirnar (með þynningu, eins og við á). Samsetning þessa miðils er gefin upp í 2. viðbæti.

Prófunarlausnir

22. Prófunarlausnir eru yfirleitt tilreiddar með því að þynna stofnlausn. Oftast eru stofnlausnir með prófunaríðefninu tilreiddar með því að leysa íðefnið upp í steinefnasneyddu (þ.e. eimuðu eða afjónuðu) vatni. Viðbótin af næringarefnunum næst með því að nota breytta Andrews-miðilinn með tífalda styrknum.

23. Hægt er að dauðhreinsa stofnlausnir prófunaríðefnisins með gufusæfingu við 121 °C í 20 mínútur eða með dauðhreinsun með síun, að því tilskildu að dauðhreinsunartæknin, sem er notuð, valdi ekki eðlissviptingu prófunaríðefnisins. Einnig er hægt að tilreiða prófunarlausnir í dauðhreinsuðu steinefnasneyddu vatni eða miðli við dauðhreinsaðar aðstæður. Við val á verklagi við dauðhreinsun stofnlausna prófunaríðefnisins skal taka tillit til varmaþols og ásogs á mismunandi yfirborð. Út af þessu er mælt með því að stofnlausnirnar séu tilreiddar við dauðhreinsaðar aðstæður, þ.e. með því að nota dauðhreinsað efni til að leysa prófunaríðefnið upp við dauðhreinsaðar aðstæður (t.d. dauðhreinsun með loga, flæðiloftsháfur (e. *laminar flow hood*), o.s.frv.) í dauðhreinsuðu vatni. Þessi tækni við tilreiðslu dauðhreinsaðra lausna gildir bæði fyrir efni og blöndur.

24. Venjulega ætti mesti, prófaði styrkur prófunaríðefnisins ekki að vera meiri en vatnsleysni þess við prófunarskilyrðin. Að því er varðar prófunaríðefni sem hafa litla vatnsleysni getur reynst nauðsynlegt að útbúa sterka stofnlausn eða dreifilausn íðefnisins með því að nota lífrænan leysi eða dreifiefni til þess að auðveldara sé að bæta réttu magni prófunaríðefnisins í prófunarmiðilinn og bæta dreifingu þess og uppleysingu. Forðast skal notkun slíkra efna í lengstu lög. Notkun hjálparleysa eða dreifiefna má ekki hafa í för með sér eiturhrif fyrir plöntur. Aseton og dímetýlformamíð eru dæmi um leysa sem eru almennt notaðir og eru ekki eitraðir fyrir plöntur í styrk að 100 µl/l. Ef notaður er leysir eða dreifiefni skal tilgreina lokastyrk og halda honum í lágmarki (≤ 100 µl/l) og allar meðferðarræktir og samanburðarræktir skulu innihalda sama styrk af leysi eða dreifiefni. Frekari leiðbeiningar um notkun dreifiefna eru gefnar í 5. heimild.

Prófunar- og samanburðarhópar

25. Fyrirliggjandi þekking á eiturhrifum prófunaríðefnisins á *Myriophyllum spicatum* úr skammtastærðarprófun kemur að gagni við að velja hæfilegan prófunarstyrk. Í endanlegu eiturhrifaprófuninni skulu alla jafna vera fimm (eins og í vaxtarhindrunarprófun á *Lemna* í kafla C.26 í þessum viðauka) til sjö prófunarstyrkleikar, raðað í jafnhlutfallaröð; þeir skulu valdir þannig að gildi styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif og EC_{50} liggi innan prófunarstyrkleikanna (sjá hér á eftir). Æskilegt er að stuðullinn sem greinir á milli prófunarstyrkleikanna fari ekki yfir 3,2; þó má nota hærra gildi ef ferill styrkháðrar svörunar er flatur. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Gera skal a.m.k. fimm samhliða prófanir fyrir hvern prófunarstyrkleika.

26. Eftirfarandi skal haft í huga þegar röð prófunarstyrkleika er ákveðin (í skammtastærðarprófun og/eða í endanlegu eiturhrifaprófuninni):

Til að tryggja viðeigandi öryggismörk skal EC_x-gildið, sem ákvarðað er, liggja innan prófunarstyrkleikanna. Ef t.d. er verið að meta EC_{50} skal hæsti prófunarstyrkleikinn vera hærri en EC_{50}-gildið. Ef EC_{50}-gildið er utan við röð prófunarstyrkleikanna verða viðkomandi öryggisbil stór og því verður hugsanlega ekki unnt að meta tölfræðileg mátgæði líkansins á traustan hátt.

Ef markmiðið er að ákvarða minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif/styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif skal minnsti prófunarstyrkurinn vera það lítill að vöxtur sé ekki marktækt minni en í samanburðarprófuninni. Auk þess skal mesti prófunarstyrkurinn vera nógu mikill til að vöxtur sé marktækt minni en í samanburðarprófuninni. Ef þetta næst ekki verður að endurtaka prófunina með mismunandi styrkleikabili (nema mesti styrkleikinn sé við leysnimark eða hámarksgildi styrks sem þörf er á, t.d. 100 mg/l).

27. Hver prófun skal innihalda samanburðarprófanir sem samanstanda af sama næringarmiðli, prófunarlífveru, (velja skal plöntuefni sem er eins einsleitt og hægt er, nýjar hliðargreinar úr forræktum, styttar í 2,5 cm frá neðsta hluta) umhverfisaðstæðum og verkferlum og prófunarkerin en án prófunaríðefnisins. Ef notaður er hjálparleysir eða dreifiefni skal gera viðbótarsamanburðarprófun með leysinum/dreifiefninu sem notað er, í sama styrk og í kerjunum með prófunaríðefninu. Samhliða samanburðarker (og ker með leysi, ef við á) skulu vera a.m.k. 10.

28. Ef ekki er þörf á ákvörðun þess styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif má breyta prófunaráætlun þannig að styrkleikastigum sé fjölgað og samhliða prófunum á hverju styrkleikastigi fækkað. Í öllum tilvikum skulu samhliða samanburðarprófanir þó vera a.m.k. tíu.

Váhrif

29. Nýjar hliðargreinar úr forræktum, styttar í 2,5 cm frá neðsta hluta, eru settar af handahófi í prófunarkerin við smitgátarskilyrði; hvert prófunarker skal innihalda eina 2,5 cm hliðargrein sem skal vera með vaxtarbrodd á öðrum endanum. Valda plöntuefnið skal vera af sömu gæðum í hverju prófunarkeri.

30. Til að lágmarka rúmfræðilegan mun á ljósstyrk eða hitastigi er nauðsynlegt að nota handahófskennda tilhögun við að staðsetja prófunarkerin í ræktunarkassanum. Einnig er nauðsynlegt að breyta um staðsetningu á kerjunum, annaðhvort í blokkum eða handahófskennt eftir mælingar (eða oftar).

31. Ef forprófanir á stöðugleika sýna að ekki er hægt að viðhalda styrk prófunaríðefnisins (þ.e. ef mældur styrkur fellur niður fyrir 80% af mældum upphafsstyrk) meðan á prófuninni stendur (í 14 daga) er mælt með hálfkyrrstöðuprófun. Í því tilviki skal láta plönturnar verða fyrir váhrifum frá nýlöguðum prófunar- og samanburðarlausnum a.m.k. einu sinni meðan á prófuninni stendur (t.d. á 7. degi). Tíðni snertingar við nýjan miðil fer eftir stöðugleika prófunaríðefnisins; hugsanlega þarf að auka tíðnina til að viðhalda nokkuð stöðugum styrk mjög óstöðugra eða rokgjarnra íðefna.

32. Í þessari prófunaraðferð er ekki fjallað um sviðsmynd af váhrifum vegna notkunar á laufblöð (úði).

Prófunarskilyrði

33. Nota skal hlýja og/eða svala, hvíta flúrlýsingu til að veita ljósstyrk á bilinu u.þ.b. 100–150 μE m^{-2} s^{-1} á mældri, virkri bylgjulengd ljóstillífunar (400–700 nm) á punktum sem eru í sömu fjarlægð frá ljósgjafanum og botn prófunarkerjanna (jafngildi ca 6 000 til 9 000 lúx) og nota birtu- og myrkvunarhringrás með 16 klst. birtu og 8 klst. myrkur. Aðferðin við ljósgreiningu og ljósmælingu hefur áhrif á mæligildið, sérstaklega tegund nemans. Æskilegra er að nota kúlulaga nema (sem nema ljós frá öllum hornum fyrir ofan og neðan mæliflötinn) og hvelfda (kósínus) nema (sem nema ljós frá öllum hornum fyrir ofan mæliflötinn) en einstefnunema og það gefur hærri niðurstöður fyrir dreifða ljósgjafa eins og lýst er hér.

34. Hitastigið í prófunarkerjunum skal vera 23 ± 2 °C. Gæta þarf að sýrustigsreki í sérstökum tilvikum, s.s. við prófun á óstöðugum íðefnum eða málmum; pH-gildið skal haldast á bilinu 6–9. Sjá frekari leiðbeiningar í 5. heimild.

Tímalengd

35. Prófuninni lýkur 14 dögum eftir að plönturnar voru færðar í prófunarkerin.

Mælingar og ákvarðanir með greiningum

36. Við upphaf prófunarinnar er lengd aðalsprota prófunarlífverunnar 2,5 cm (sjá 29. lið); hann er mældur með kvarða (sjá 4. viðbæti) eða með ljósmyndun og myndgreiningu. Ákvarða þarf lengd á aðalsprota prófunarlífveru, sem virðist eðlileg eða óeðlileg, við upphaf prófunarinnar, a.m.k. einu sinni á 14 daga váhrifatímabilinu og við lok prófunarinnar. Athugasemd: Sem staðgöngukostur fyrir þá sem eru ekki með myndgreiningu: ef vinnuborðið er dauðhreinsað áður en plöntum er bætt í prófunarkerin er einnig hægt að nota dauðhreinsaðan kvarða til að mæla lengd aðalsprotans við upphaf prófunarinnar og meðan á henni stendur. Skrá skal breytingar á þroskun plantnanna, t.d. að því er varðar afmyndun sprota, útlit, vísbendingar um drep, gulnun, rof í eða minnkaða flothæfni, og lengd róta og útlit þeirra. Einnig skal tilgreina marktæka þætti í prófunarmiðlinum (t.d. óuppleyst efni, þörungavöxtur, sveppir og bakteríur í prófunarkerinu).

37. Auk ákvörðunar á lengd aðalsprotans meðan á prófuninni stendur skal einnig meta áhrif prófunaríðefnisins á þrjár (eða fleiri) eftirfarandi mælibreytur:

(i) Heildarlengd hliðargreina

(ii) Heildarlengd sprota

(iii) Heildarlengd róta

(iv) Votvigt

(v) Þurrvigt

(vi) Fjöldi sveipa

1. athugasemd: Athuganir, sem gerðar eru meðan á skammtastærðarprófun stendur, geta hjálpað til við að velja viðeigandi viðbótarmælingar úr breytunum sex sem eru tilgreindar hér að framan.

2. athugasemd: Mjög æskilegt er að ákvarða blaut- og þurrvigt (iv. og v. breyta)

3. athugasemd: Vegna þess að súkrósi og birta (rætur komast í snertingu við birtu meðan á prófun stendur) geta haft áhrif á áxínbera (plöntuvaxtarhormón) og sum íðefni geta haft áxínlíkan verkunarhátt er vafasamt að telja rótarendapunkta með (iii. breyta).

4. athugasemd: Niðurstöður úr hringprófun sýna háan fráviksstuðul (> 60%) fyrir heildarlengd hliðargreina (i. breyta). Heildarlengd hliðargreina fellur í öllum tilvikum undir mælingu á heildarlengd sprota (ii. breyta) sem sýnir ásættanlegri fráviksstuðul sem nemur < 30%.

5. athugasemd: Af ofangreindum atriðum leiðir að helstu endapunktar mælinga sem mælt er með eru: heildarlengd sprota, votvigt og þurrvigt (ii., iv. og v. breyta); vi. breyta — fjöldi sveipa — er rannsakandans að dæma um.

38. Lengd aðalsprotans og fjöldi sveipa hafa sína kosti að því er varðar að þá er hægt að ákvarða fyrir hvert prófunar- og samanburðarker við upphaf prófunar, meðan á henni stendur og við lok hennar með ljósmyndun og myndgreiningu þó að einnig sé hægt að nota (dauðhreinsaðan) kvarða.

39. Hægt er að mæla heildarlengd hliðargreina, heildarlengd róta (sem summu allra hliðargreina eða róta) og heildarlengd sprota (sem summu af lengd aðalsprotans og heildarlengd hliðargreina) með kvarða við lok váhrifa.

40. Ákvarða skal þurr- og/eða votvigt í upphafi prófunarinnar með sýni af forrækt, sem er dæmigerð fyrir þá sem er notuð til að hefja prófunina, og við lok hennar með plöntuefni úr öllum prófunar- og samanburðarkerjunum.

41. Hægt er að ákvarða heildarlengd hliðargreina, heildarlengd sprota, heildarlengd róta, votvigt, þurrvigt og fjölda sveipa sem hér segir:

(i) Heildarlengd hliðargreina: Hægt er að ákvarða heildarlengd hliðargreina með því að mæla allar hliðargreinar með kvarða við lok váhrifa. Heildarlengd hliðargreina er summa allra hliðargreina í hverju prófunar- og samanburðarkeri.

(ii) Heildarlengd sprota: Hægt er að ákvarða lengd aðalsprotans með myndgreiningu eða með því að nota kvarða. Heildarlengd sprota er summan af heildarlengd hliðargreina og lengd aðalsprota í hverju prófunar- og samanburðarkeri við lok váhrifa.

(iii) Heildarlengd róta: Hægt er að ákvarða heildarlengd róta með því að mæla allar ræturnar með kvarða við lok váhrifa. Heildarlengd róta er summa allra róta í hverju prófunar- og samanburðarkeri.

(iv) Votvigt: Hægt er að ákvarða votvigt með því að vega prófunarlífverurnar við lok váhrifa. Allt plöntuefni í hverju prófunar- og samanburðarkeri verður hreinsað með eimuðu vatni og þerrað með sellulósapappír. Eftir þennan undirbúning er votvigtin ákvörðuð með vigtun. Upphafslífmassi (votvigt) er ákvarðaður á grundvelli sýnis af prófunarlífverum sem er tekið úr sömu lotu og notuð var til að kveikja vöxt í prófunarkerjunum.

(v) Þurrvigt: Eftir undirbúning til að ákvarða votvigtina eru prófunarlífverurnar þurrkaðar í stöðuga þyngd við 60 °C. Þessi massi er þurrvigtin. Upphafslífmassi (þurrvigt) er ákvarðaður á grundvelli sýnis af prófunarlífverum sem er tekið úr sömu lotu og notuð var til að kveikja vöxt í prófunarkerjunum.

(vi) Fjöldi sveipa: Allir sveipir eru taldir eftir endilöngum aðalsprotanum.

Tíðni mælinga og ákvarðana með greiningum

42. Ef tilhögunin er kyrrstöðuprófun skal mæla sýrustig hverrar meðferðarprófunar í upphafi og við lok hennar. Ef tilhögunin er hálfkyrrstöðuprófun skal mæla sýrustig í hverri lotu af „nýrri“ prófunarlausn fyrir endurnýjunina og einnig í samsvarandi „gömlum“ lausnum.

43. Ljósstyrkur skal mældur í ræktunarklefanum, ræktunarkassanum eða herberginu á punktum sem eru í sömu fjarlægð frá ljósgjafanum og prófunarlífverurnar. Mælingar skulu gerðar a.m.k. einu sinni meðan á prófuninni stendur. Hitastigið í miðlinum í staðgengilskeri, sem er haft við sömu skilyrði í ræktunarklefanum, ræktunarkassanum eða herberginu, skal skráð a.m.k. einu sinni á dag (eða stöðugt með gagnaskráningartæki).

44. Í prófuninni er styrkur prófunaríðefnisins eða -íðefnanna ákvarðaður með hæfilegu millibili. Lágmarkskrafa í kyrrstöðuprófun er að ákvarða styrkinn við upphaf og lok prófunarinnar.

45. Í hálfkyrrstöðuprófunum, þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunaríðefnisins eða -íðefnanna haldist innan ± 20% af nafnstyrk, er nauðsynlegt að greina allar nýlagaðar prófunarlausnir og sömu lausnir við hverja endurnýjun. Í prófunum, þar sem mældir upphafsstyrkleikar prófunaríðefnis eða -íðefna liggja utan markanna ± 20% af nafnstyrk en sýna má fram á endurtekningarnákvæmni og stöðugleika upphafsstyrkleikanna (þ.e. innan markanna 80–120% af upphaflegum styrkleika), þarf þó ekki að gera efnafræðilegar greiningar nema á hæsta og lægsta styrk. Í öllum tilvikum þarf ákvörðun á prófunarstyrkleikum fyrir endurnýjun aðeins að fara fram í einu samhliða prófunarkeri fyrir hvern prófunarstyrk (eða samsettu innihaldi kerja í samhliða prófuninni).

46. Ef unnt er að sýna fram á að prófunarstyrkur hafi haldist á fullnægjandi hátt innan markanna ± 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni er heimilt að greining á niðurstöðunum grundvallist hvort heldur sem er á nafngildi eða mældu upphafsgildi. Ef frávik frá nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk er ekki innan ± 20% skal byggja greiningu á niðurstöðunum á faldmeðaltali styrks meðan á váhrifum stendur eða á líkönum sem lýsa lækkun á styrk prófunaríðefnisins (5. heimild).

Markprófun

47. Við sumar aðstæður, t.d. ef forprófun bendir til þess að prófunaríðefnið hafi engin eiturhrif við styrk að 100 mg/l eða að leysnimörkum sínum í prófunarmiðlinum eða, ef um er að ræða samsetningu sem er við dreifanleikamörk sín, má gera markprófun með samanburði svörunar í samanburðarhópi og einum meðferðarhópi (100 mg/l eða styrk sem er jafn leysnimörkum). Eindregið er mælt með að þetta sé stutt með greiningu á styrk váhrifa. Öll prófunarskilyrði og gildisviðmiðanir, sem lýst hefur verið, eiga við um markprófun, að því undanteknu að fjöldi samhliða meðferðarprófana skal tvöfaldaður. Greina má vöxt í samanburðar- og meðferðarhópnum með tölfræðiprófi til að bera saman meðaltöl, t.d. t-próf.

GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Svarbreytur

48. Tilgangur prófunarinnar er að ákvarða áhrif prófunaríðefnisins á vöxt *Myriophyllum spicatum*-plantna. Í þessari prófunaraðferð er tveimur svarbreytum lýst.

a) Meðaltal sértæks vaxtarhraða: Þessi svarbreyta er reiknuð út á grundvelli breytinga á logrum aðalsprotalengdar og að auki á grundvelli breytinga á logrum annarra mælibreyta, þ.e. heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa á tímabilinu (gefið upp fyrir hvern dag) í samanburðum og í hverjum meðferðarhóp. Athugasemd: Að því er varðar mælibreytuna heildarlengd hliðargreina og heildarlengd róta er ekki mögulegt að reikna út meðaltal sértæks vaxtarhraða. Við upphaf prófunarinnar er prófunarlífveran hvorki með hliðargreinar né rætur (byggt á undirbúningi í forræktinni); upphafsgildið er núll og útreikningur á meðaltali sértæks vaxtarhraða ekki skilgreindur.

b) Afrakstur: Þessi svarbreyta er reiknuð út á grundvelli breytinga á lengd aðalsprotans og að auki á grundvelli breytinga á öðrum mælibreytum — *þ.e.* helst heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjöldi sveipa og aðrar breytur ef þær eru taldar koma að gagni — í samanburðarprófunum og í hverjum meðferðarhóp að lokum prófunarinnar.

49. Mat á eiturhrifum skal byggt á lengd aðalsprotans og þremur viðbótarmælibreytum (þ.e. helst heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa, sjá 37. lið og 2., 4. og 5. athugasemd við þennan lið) vegna þess að sum íðefni geta haft miklu meiri áhrif á aðrar mælibreytur en lengd aðalsprotans. Þau áhrif myndu ekki greinast ef aðeins væru gerðir útreikningar á lengd aðalsprotans.

Meðaltal sértæks vaxtarhraða

50. Meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir tiltekið tímabil er reiknað út sem logruð aukning vaxtarbreytanna — lengdar aðalsprotans og þriggja viðbótarmælibreyta (*þ.e.* heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa) — með því að nota formúluna hér á eftir fyrir hverja samhliða samanburðarprófun og samhliða meðferðarprófun:

$$\mu_{i-j} = \frac{In(N_j) - In(N_j)}{t}$$

Þar sem:

μ_{i-j}: meðaltal sértæks vaxtarhraða frá tímanum i til j

N_i: er mælibreyta í prófunar- eða samanburðarkeri á tímanum i

N_j: er mælibreyta í prófunar- eða samanburðarkeri á tímanum j

t: er tímabilið frá i til j

Reiknað er út meðalgildi vaxtarhraða fyrir hvern meðferðar- og samanburðarhóp, ásamt dreifnimati.

51. Reikna skal meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir allt prófunartímabilið (tíminn „i“ í formúlunni hér á undan er upphaf prófunarinnar og tíminn „j“ er lok prófunarinnar). Reiknað er út meðalgildi fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða ásamt dreifnimati fyrir hvern prófunarstyrk og samanburðarprófun. Einnig skal ákvarða vaxtarhraðann þrep fyrir þrep til að meta áhrif prófunaríðefnisins á váhrifatímabilinu (t.d. með því að skoða log-umbreytta vaxtarferla).

52. Hlutfall hindrunar á vaxtarhraða (I_r) á hverju styrkleikastigi prófunarefnis (meðferðarhópur) er reiknaður með eftirfarandi formúlu:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

Þar sem:

% Ir: er hlutfall hindrunar í meðaltali sértæks vaxtarhraða

μC: er meðalgildi μ í samanburðarprófuninni

μT: er meðalgildi μ í meðferðarhópnum

Afrakstur

53. Áhrif á afrakstur eru ákvörðuð á grundvelli mælibreytnanna lengd aðalsprotans og þriggja viðbótarmælibreytna (þ.e. helst heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa) úr hverju prófunarkeri við upphaf og endi prófunarinnar. Til að finna votvigt eða þurrvigt er ákvörðun á upphafslífmassa byggð á sýni af prófunarlífverum sem er tekið úr sömu lotu og notuð var til að kveikja vöxt í prófunarkerjunum. Reiknað er út meðalgildi afraksturs ásamt dreifnimati fyrir hvern prófunarstyrk og samanburðarprófun. Hægt er að reikna út meðalhundraðshlutfall hindrunar á afrakstri (% I_y) fyrir hvern meðferðarhóp með eftirfarandi hætti:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

Þar sem:

% Iy: er hundraðshlutfall minnkunar á afrakstri

bC: er lokalífmassi að frádregnum upphafslífmassa í samanburðarhópnum

bT: er lokalífmassi að frádregnum upphafslífmassa í meðferðarhópnum

Tvöföldunartími

54. Til að ákvarða tvöföldunartíma lengdar aðalsprotans (T_d) og samkvæmni við þá gildisviðmiðun (sjá 8. lið) er notuð eftirfarandi formúla með gögnum um samanburðarkerin:

$T_d = \ln 2/\mu$

Þar sem μ er meðaltal sértæks vaxtarhraða sem er ákvarðað eins og lýst er í 50.–52 lið.

Ferlar styrkháðrar svörunar teiknaðir

55. Teikna skal ferla styrkháðrar svörunar, sem sýna meðalvaxtarhindrun svarbreytunnar (I_r, eða I_y reiknuð eins og sýnt er í 53. lið), og lograðan styrk prófunaríðefnisins.

Mat á EC_x

56. Mat á EC_x skal byggt bæði á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x) og afrakstri (E_yC_x), hvort um sig skal byggjast á lengd aðalsprotans og mögulega á viðbótarmælibreytum (*þ.e.* helst heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa). Ástæðan fyrir því er sú að til eru íðefni sem hafa ekki sömu áhrif á lengd aðalsprotans og aðrar mælibreytur. Æskilegir mæliþættir fyrir eiturhrifin eru því EC_x-gildin fjögur sem reiknuð eru út fyrir hvert hindrunarstig x: E_rC_x (lengd aðalsprotans); E_rC_x (*þ.e.* helst heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjöldi sveipa); E_yC_x (lengd aðalsprotans); og E_yC_x (*þ.e.* helst heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjöldi sveipa).

57. Tekið skal mið af því að gildin fyrir EC_x, sem reiknuð eru út með þessum tveimur svarbreytum, eru ekki samanburðarhæf og sá munur er hafður í huga þegar niðurstöður prófunarinnar eru notaðar. Vegna stærðfræðilegs grundvallar viðkomandi nálgana verða EC_x-gildi, sem byggjast á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x), í flestum tilvikum hærri en niðurstöður sem byggðar eru á afrakstri (E_yC_x), ef prófunarskilyrðum þessarar prófunaraðferðar er fylgt. Þessi munur skal ekki túlkaður sem munur á næmi svarbreytnanna tveggja, heldur einfaldlega þannig að gildin séu stærðfræðilega frábrugðin hvort öðru.

Tölfræðiaðferðir

58. Markmiðið er að fá fram megindlegt samband styrks og svörunar með aðhvarfsgreiningu. Hægt er að nota vegið línulegt aðhvarf þegar svörunargögnin hafa fengið línulega umbreytingu – t.d. með probit- eða logit- eða Weibull-líkönum (7. heimild), en ólínulegar aðhvarfsgreiningar eru æskilegri aðferðir sem ráða betur við óhjákvæmilegar misfellur í gögnum og frávik frá jafnri dreifingu. Nærri núlli, eða algerri vaxtarhindrun, geta slíkar misfellur magnast við umbreytinguna og truflað greininguna (7. heimild). Tekið skal mið af því að staðalaðferðir við greiningu sem nota probit-, logit- eða Weibull-umbreytingar eru ætlaðar til notkunar á skammtabundnum gögnum (t.d. dánartíðni eða lifun) og þeim skal breyta til að þær nái yfir gögn um vaxtarhraða eða afrakstur. Sértækar aðferðir við ákvörðun á EC_x-gildum með samfelldum gögnum má finna í 8.–10. heimild.

59. Nota skal feril styrks á móti svörun til útreikninga á punktmati EC_x-gilda fyrir allar svarbreytur sem þarf að greina. Ákvarða skal 95% öryggismörk fyrir hvert mat, ef unnt er. Meta skal mátgæði gagna við aðhvarfslíkanið, annaðhvort myndrænt eða tölfræðilega. Gera skal aðhvarfsgreiningar með svörun hverrar samhliða prófunar fyrir sig, ekki með meðaltali meðferðarhópa.

60. Einnig má fá mat á EC_{50}-gildum og öryggismörk með því að nota línulegan innreikning og nálgun með handahófsúrtökum (10. heimild) ef fyrirliggjandi aðhvarfslíkön/-aðferðir henta ekki fyrir gögnin.

61. Nauðsynlegt er að bera saman meðaltal meðferðarprófana með dreifnigreiningu til að fá mat á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif, og þar með styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Meðaltalið fyrir hvern styrkleika er svo borið saman við meðaltal samanburðarins með viðeigandi aðferð þar sem notaður er margfaldur samanburður eða leitniprófun. Próf Dunnetts eða Williams geta verið gagnleg (12.–16. heimild). Nauðsynlegt er að meta hvort forsenda dreifnigreiningar um einsleitni dreifninnar stenst. Matið er hægt að framkvæma myndrænt eða með hefðbundnu prófi (15. heimild). Prófanir Levens eða Bartletts eru viðeigandi. Ef forsendan um einsleitni dreifni stenst ekki er stundum hægt að leiðrétta slíkt með lograðri umbreytingu gagnanna. Ef misleitni dreifninnar er mjög mikil, og ekki hægt að leiðrétta hana með umbreytingu, má taka til athugunar að gera greiningu með aðferðum eins og Jonkheere-leitniprófun með stiglækkun. Viðbótarleiðbeiningar um ákvörðun styrks, sem hefur engin merkjanleg áhrif, má finna í 10. heimild.

62. Vegna nýlegra framfara í vísindum er mælt með að hætt verði að nota hugtakið „styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif“ (NOEC) og nota í staðinn punktmat EC_x-gilda, byggt á aðhvarfi. Ekki er búið að fastsetja viðeigandi x-gildi fyrir þetta *Myriophyllum* próf. Á bilinu 10–20% virðist þó vera rétt svið (með hliðsjón af svarbreytunni sem valin er) og æskilegt er að gerð sé grein fyrir EC_{10} og EC_{20} og öryggismörkum þeirra.

Skýrslugjöf

63. Prófunarskýrslan inniheldur eftirfarandi upplýsingar:

Prófunaríðefni

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv., (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis, ef við á).

Fjölþáttaefni, UVCB-efni eða blanda:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Prófunartegund

— Vísindaheiti og uppruni.

Prófunarskilyrði

— Prófunaraðferðin sem er notuð (kyrrstöðu- eða hálfkyrrstöðuprófun).

— Upphafsdagur prófunarinnar og hve lengi hún stendur.

— Prófunarmiðill.

— Lýsing á tilhögun tilraunar: prófunarker og lok, rúmmál lausna, lengd aðalsprotans í hverju prófunarkeri við upphaf prófunarinnar.

— Prófunarstyrkur (nafnstyrkur og mældur styrkur, eftir því sem við á) og fjöldi samhliða prófana fyrir hvern styrk.

— Aðferðir við tilreiðslu stofnlausna og prófunarlausna, þ.m.t. öll notkun leysa eða dreifiefna.

— Hitastig meðan á prófun stendur.

— Ljósgjafi, ljósstyrkur og einsleitni.

— Sýrustig prófunar- og samanburðarmiðilsins.

— Aðferð til að greina prófunaríðefni með viðkomandi gæðamatsgögnum (fullgildingarrannsóknir, staðalfrávik eða öryggismörk greininga).

— Aðferðir til að ákvarða lengd aðalsprotans og aðrar mælibreytur, t.d. heildarlengd hliðargreina, heildarlengd sprota, heildarlengd róta, votvigt, þurrvigt eða fjöldi sveipa.

— Staða ræktunar (dauðhreinsuð eða ekki) í hverju prófunar- og samanburðarkeri við hverja mælingu.

— Öll frávik frá prófunaraðferðinni.

Niðurstöður

— Óunnin gögn: lengd aðalsprotans og aðrar mælibreytur í hverju prófunar- og samanburðarkeri við hverja mælingu og greiningu.

— Meðaltal og staðalfrávik fyrir hverja mælibreytu.

— Vaxtarferlar fyrir hverja mælibreytu.

— Útreikningar á svarbreytum fyrir hverja samhliða meðferðarprófun, með meðalgildum og frávikstuðli fyrir samhliða prófanir.

— Myndræn útfærsla á sambandi styrks og áhrifa.

— Mat á endapunktum eiturhrifa fyrir svarbreytur, t.d. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, og viðkomandi öryggisbil. Minnsti styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og/eða styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, ef þeir hafa verið reiknaðir út, og tölfræðiaðferðirnar sem notaðar voru til að ákvarða þá.

— Ef notuð var dreifnigreining: umfang áhrifanna sem greindust (t.d. minnsti marktækur munur).

— Öll vaxtarörvun sem fram kom í öllum meðferðarprófunum.

— Öll sýnileg merki um eitrun fyrir plöntur, sem og mælingar á prófunarlausnum.

— Umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif sem frávik frá prófunaraðferðinni hafa á niðurstöðu prófunarinnar.

HEIMILDIR:

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. et al. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.

(3) Kafli C.26 í þessum viðauka: Vaxtarhindrunarprófun á *Lemna* sp.

(4) OECD (2014), "*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(5) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Kafli C.51 í þessum viðauka: Eiturhrifaprófun á *Myriophyllum spicatum* í vatni og seti

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

———

1. viðbætir

SKILGREININGAR

Lífmassi er vot- og/eða þurrvigt lifandi efnis sem er í stofni. Í þessari prófun er lífmassi summa aðalsprotans, allra hliðargreina og allra róta.

Íðefni er efni eða blanda.

Gulnun er breyting á lit prófunarlífveru úr grænum yfir í gulleitan, einkum lit sveipanna.

EC_x er sá styrkur prófunaríðefnisins, sem er uppleyst í prófunarmiðlinum, sem veldur x% (t.d. 50%) samdrætti í vexti hjá *Myriophyllum spicatum* á tilgreindu váhrifatímabili (frávik frá fullum eða eðlilegum prófunartíma skulu tekin fram með skýrum hætti). Til ótvíræðrar merkingar á EC-gildum, sem leidd eru af vaxtarhraða eða afrakstri, er táknið „E_rC“ notað fyrir vaxtarhraða og E_yC fyrir afrakstur, að viðbættri mælibreytunni sem notuð er, t.d. E_rC (lengd aðalsprotans).

Vöxtur er aukning á mælibreytunni, t.d. lengd aðalsprotans, heildarlengd hliðargreina, heildarlengd sprota, heildarlengd róta, votvigt, þurrvigt eða fjöldi sveipa, á prófunartímabilinu.

Vaxtarhraði (meðaltal sértæks vaxtarhraða) er logruð aukning mælibreytunnar meðan á váhrifatímabilinu stendur. *Athugasemd:* Svarbreytur sem tengjast vaxtarhraða eru óháðar lengd prófunarinnar svo fremi sem vaxtarmynstur samanburðarlífvera, sem verða ekki fyrir váhrifum, er veldismynstur.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur þar sem íðefnið reynist, innan tilgreinds váhrifatímabils, draga úr vexti á tölfræðilega marktækan hátt (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhóp. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal þó að valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Mælibreytur eru hverjar þær breytur sem eru mældar, með hjálp einnar svarbreytu eða fleiri, til að lýsa endapunkti prófunarinnar. Í þessari prófunaraðferð eru lengd aðalsprotans, heildarlengd hliðargreina, heildarlengd sprota, heildarlengd róta, votvigt, þurrvigt og fjöldi sveipa mælibreytur.

Einrækt er rækt með einni tegund plantna.

Drep er dauður (þ.e. hvítur eða dökkbrúnn) vefur prófunarlífverunnar.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC) er sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif

Svarbreyta er breyta sem er notuð til að meta eiturhrif og er leidd út af öllum mældum breytum sem lýsa lífmassa með mismunandi reikniaðferðum. Að því er varðar þessa prófunaraðferð eru vaxtarhraði og afrakstur svarbreytur sem eru leiddar út frá mælibreytum s.s. lengd aðalsprotans, heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa.

Hálfkyrrstöðuprófun (endurnýjun) er prófun þar sem prófunarlausnin er endurnýjuð með ákveðnu millibili meðan á prófuninni stendur.

Kyrrstöðuprófun er prófunaraðferð þar sem prófunarlausn er ekki endurnýjuð meðan á prófuninni stendur.

Prófunaríðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Endapunktur prófunarinnar lýsir almennum þætti sem prófunaríðefnið breytir miðað við samanburðarprófanir og sem er tilgangur prófunarinnar. Í þessari prófunaraðferð er endapunktur prófunarinnar vaxtarhindrun sem hægt er að gefa upp með mismunandi svarbreytum sem eru byggðar á einni mælibreytu eða fleiri.

Prófunarmiðill er tilbúni ræktunarmiðillinn í heild sinni sem prófunarplönturnar vaxa í meðan váhrifin frá prófunaríðefninu standa yfir. Yfirleitt er prófunaríðefnið uppleyst í prófunarmiðlinum.

UVCB-efni er efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókið myndefni eða líffræðilegt efni.

Afrakstur er gildi mælibreytu sem lýsir lífmassanum við lok váhrifatímabilsins að frádregnu gildi mælibreytunnar við upphaf váhrifatímabilsins. Athugasemd: Ef vaxtarmynstur lífvera, sem hafa ekki orðið fyrir váhrifum, er veldismynstur minnka svarbreytur sem byggjast á afrakstri eftir því sem líður á prófunina.

———

2. viðbætir

BREYTTUR ANDREWS-MIÐILL Í STOFNRÆKT OG FORRÆKT

Breytti Andrews-miðillinn, sem er nauðsynlegur fyrir stofnrækt og forrækt, er tilreiddur úr fimm stofnlausnum næringarefna, sem voru tilreiddar hver fyrir sig, að viðbættum 3% súkrósa.

Tafla 1

Samsetning Andrews-næringarlausnar: (ASTM Designation E 1913-04)

Framleiðsla á stofnlausnum næringarefna			Framleiðsla á næringarlausn
Stofnlausn	Íðefni	Upphafsþyngd á hverja 1 000 ml	ml á hverja 5 l af næringarlausn
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Sjá hér á eftir, stofnlausn 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Stofnlausnir má geyma í kæliskáp í 6 mánuði (við 5–10 °C). Einungis stofnlausn nr. 5 hefur takmarkað geymsluþol (tvo mánuði).

Tafla 2

Framleiðsla á stofnlausn 3.1 til að tilreiða stofnlausn 3

Íðefni	Upphafleg þyngd g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Eftir tilreiðslu á stofnlausn 3.1 (tafla 2) skal djúpfrysta þessa lausn í u.þ.b. 11 ml deiliskömmtum (við a.m.k. -18 °C). Djúpfrystir skammtar eru með fimm ára geymsluþol.

Til að tilreiða stofnlausn 3 er stofnlausn 3.1 þídd, 10 ml af henni sett í 1 l mæliflösku og fyllt upp að markinu í flöskunni með ofurhreinu vatni.

Til að fá breyttan Andrews-miðil eru u.þ.b. 2500 ml af ofurhreinu vatni settir í mæliflösku. Eftir að 50 ml af hvorri stofnlausn hefur verið bætt við er mæliflaskan fyllt upp að 90% með ofurhreinu vatni og pH-gildið stillt að 5,8.

Þar á eftir er bætt við 150 g af uppleystum súkrósa (3% í hverja 5 l); síðan er mæliflaskan fyllt upp að markinu með ofurhreinu vatni. Að lokum er næringarlausnin sett í 1 l Schott -flöskur og gufusæfð við 121 °C í 20 mínútur.

Hægt er að halda næringarlausninni, sem fékkst með þessu móti, dauðhreinsaðri í kæliskáp (við 5–10 °C) í þrjá mánuði.

Breyttur Andrews-miðill fyrir eiturhrifaprófun án sets

Úr fimm stofnlausnum næringarefna, sem þegar hefur verið getið um í töflum 1 og 2, er tilreiddur breyttur Andrews-miðill með tíföldum styrk til að tilreiða prófunarlausnirnar, með viðbættum 30% súkrósa. Til þess eru u.þ.b. 100 ml af ofurhreinu vatni settir í 1 l mæliflösku. Eftir að 100 ml hefur verið bætt við hverja stofnlausn er ph-gildið stillt í 5,8. Þar á eftir er bætt við 30% af uppleystum súkrósa (300 g í hverja 1000 ml); síðan er mæliflaskan fyllt upp að markinu með ofurhreinu vatni.

Að lokum er næringarlausnin sett í 0,5 l Schott -flöskur og gufusæfð við 121 °C í 20 mínútur.

Hægt er að halda breyttu næringarlausninni með tífalda styrknum, sem fékkst með þessu móti, dauðhreinsaðri í kæliskáp (við 5–10 °C) í þrjá mánuði.

———

3. viðbætir

VIÐHALD STOFNRÆKTAR

Í þessum 3. viðbæti er lýst stofnrækt af *Myriophyllum spicatum* L ([1]), tvíkímblöðungi sem er í kafi, tegund af maraætt. Á bilinu júní til ágúst standa lítt áberandi bleik-hvít blóm upp úr vatnsyfirborðinu. Rætur plantnanna eru kerfi traustra jarðstöngla og þær er hægt að finna í vötnum á öllu norðurhveli jarðar í næringarríkum en þó ómenguðum og kalsítríkum lygnum vötnum með gruggugu undirlagi. *Myriophyllum spicatum* kýs ferskvatn en finnst einnig í ísöltu vatni.

Í stofnrækt án sets við rannsóknarstofuskilyrði þarf dauðhreinsaðar plöntur. Dauðhreinsaðar plöntur eru fáanlegar frá rannsóknarstofunni í visteiturefnafræði við hið þýska Umweltbundesamt (Umhverfisstofnun Þýskalands).

Að öðrum kosti er hægt að útbúa prófunarlífverur úr ódauðhreinsuðum plöntum í samræmi við „ASTM designation E 1913-04“. Sjá hér á eftir — útdráttur úr „ASTM Standard Guide“ — verkferli við ræktun *Myriophyllum sibiricum* sem er tekin úr náttúrunni:

„Ef byrjað er með ódauðhreinsaðar plöntur, sem eru teknar úr náttúrunni, skal safna vetrarsprotum *M. sibiricum* að hausti. Vetrarsprotarnir eru settir í 20 l ker sem inniheldur 5 cm af dauðhreinsuðu seti sem er hulið kíslsandi eða t.d. Turface® og 18 l af prófefnisvatni. Kerið er loftblandað og haldið við hitastigið 15 °C og flæðishraða sem nemur 200 til 300 μmol m^{-2} s^{-1} í 16 klst á dag. Hægt er að viðhalda plönturæktuninni í kerinu sem varauppsprettu plantna ef dauðhreinsaðar plönturæktir eyðileggjast vegna vélrænna bilana í vaxtarskápnum, mengunar eða af öðrum ástæðum. Plöntur sem vaxa í kerinu eru ekki dauðhreinsaðar og ekki er hægt að viðhalda dauðhreinsuðum ræktum í loturæktunarkerfi. Til að dauðhreinsa ræktina eru plönturnar teknar úr kerinu og skolaðar með rennandi afjónuðu vatni í u.þ.b. hálfa klukkustund. Plönturnar eru sótthreinsaðar í flæðiloftsskáp (e. *laminar airflow cabinet*) við smitgátarskilyrði í innan við 20 mínútur (þar til mestallur plöntuvefurinn er bleiktur og einungis vaxtartoppurinn er ennþá grænn) í 3% (massi miðað við rúmmál) natríumhýpóklórítlausn sem inniheldur 0,01% af hentugu yfirborðsvirku efni. Sótthreinsiefnið og plöntuefnið eru hrist. Hlutar með nokkrum stönguliðamótum eru færðir yfir í dauðhreinsuð tilraunaglös, sem innihalda 45 ml af dauðhreinsuðum breyttum Andrews-miðli, og þeim lokað með einföldum tilraunaglasalokum. Einungis einn plöntuhluti er settur í hvert prófunarker. Notuð er rannsóknarstofuþéttifilma til að festa lokið á ræktunarkerið. Þegar dauðhreinsaðri ræktun hefur verið komið á fót skal færa plöntuhluta með nokkrum stönguliðamótum yfir í ný prófunarker, sem innihalda nýtt, fljótandi næringaræti, á 10–12 daga fresti. Eins og sýnt er fram á með ræktun á agarskálum verða plönturnar að vera dauðhreinsaðar og haldast þannig í átta vikur áður en hægt er að hefja prófunina.“

Þar eð breyttur Andrews-miðill inniheldur súkrósa (sem örvar vöxt sveppa og baktería) verður að undirbúa allt efni, lausnir og ræktir við dauðhreinsaðar aðstæður. Allir vökvar, sem og búnaður, eru dauðhreinsuð fyrir notkun. Dauðhreinsun fer fram með meðhöndlun með hituðu lofti (210 °C) í 4 klst. eða gufusæfingu í 20 mínútur við 121 °C. Auk þess fá allar flöskur, diskar, skálar o.s.frv. og annar búnaður logameðhöndlun á dauðhreinsuðu vinnuborði rétt fyrir notkun.

Hægt er að viðhalda stofnræktum við minni birtu og lægra hitastig (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) í lengri tíma án þess að það þurfi að stofna til þeirra að nýju. Nota skal sama *Myriophyllum*-vaxtarmiðil og notaður er í prófanir en nota má annan næringarríkan miðil fyrir stofnræktir.

Plöntuhlutunum er dreift í hreinrækt í nokkrar 500 ml keiluflöskur og/eða 2 000 ml Fernbach-flöskur, hver um sig fyllt með u.þ.b. 450 ml annars vegar og 1 000 ml hins vegar af breyttum Andrews-miðli. Síðan er flöskunum lokað í hreinrækt með sellulósatappa.

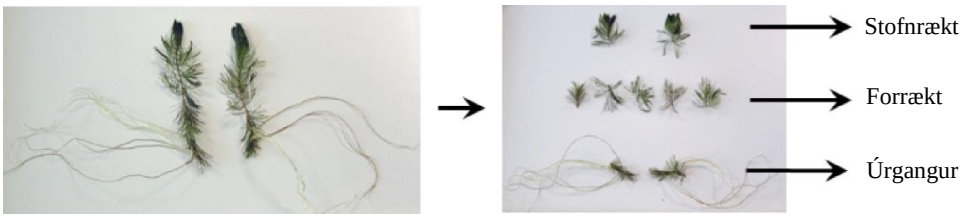
Auk þess er algerlega nauðsynlegt að logameðhöndla búnaðinn vandlega á dauðhreinsaða vinnubekknum rétt fyrir notkun. Færa skal plönturnar í nýja næringarlausn á u.þ.b. þriggja vikna fresti, allt eftir fjölda og stærð.

Hægt er að nota enda sem og hluta af miðju stofnsins í þessa endurnýjuðu ræktun. Fjöldi og stærð plantna sem eru færðar yfir (eða hluta plantna) ræðst af fjölda plantna sem þörf er á. Til dæmis er hægt að færa fimm sprotahluta yfir í eina Fernbach-flösku og þrjá sprotahluta yfir í eina keiluflösku, hvern um sig 5 cm á lengd. Henda skal öllum hlutum sem hafa fest rætur, blómgast, eru dauðir eða skera sig úr á annan hátt.

([1]) Carl von Linné (* May, 23th, 1707 in Råshult/Älmhult; † January, 10th, 1778 in Uppsala).

Mynd 1

Plöntur skornar í stofn- og forrækt eftir þriggja vikna ræktun



Ræktun plantna skal fara fram í 500 ml keiluflöskum og 2 000 ml Fernbach-flöskum í ræktunarkassa með kælingu við 20 ± 2 °C með samfelldri birtu við u.þ.b. 100–150 µE m^{-2} s^{-1} eða 6 000–9 000 Lúx (klefalýsing með litarhitastigi „hlýtt, hvítt ljós“).

Mynd 2

Ræktun plantna í kæliræktunarkössum með klefalýsingu



Nota skal efnafræðilega hrein (sýruþvegin) og dauðhreinsuð ræktunarker og smitgátaraðferðir. Ef um er að ræða að stofnrækt mengast, t.d. af þörungum, sveppum og/eða bakteríum, skal undirbúa nýja ræktun eða nota stofnrækt frá annarri rannsóknarstofu til að endurnýja ræktunina.

———

4. viðbætir

VIÐHALD FORRÆKTAR OG UNDIRBÚNINGUR PRÓFUNARLÍFVERU FYRIR PRÓFUN

Til að fá fram forrækt eru sprotar af stofnrækt skornir í hluta, hvern með tveimur sveipum; hlutarnir eru settir í Fernbach-flöskur sem eru fylltar með breyttum Andrews-miðli (með 3% súkrósa). Hver flaska getur innihaldið allt að 50 sprotahluta. Þó skal þess gætt að hlutarnir séu lífvænlegir og séu ekki með rætur og hliðargreinar eða brum (sjá mynd 1 í 3. viðbæti).

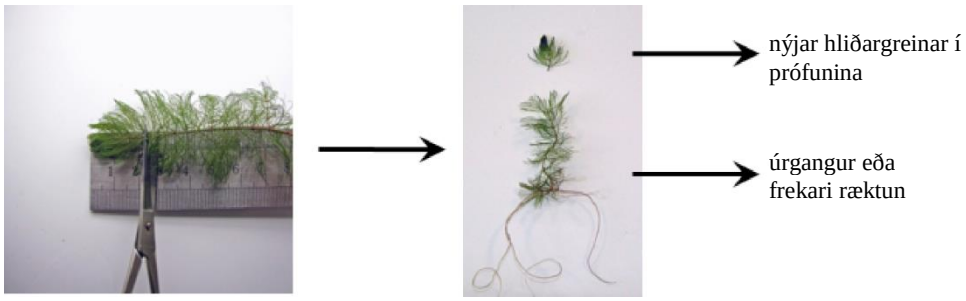
Forræktarlífverurnar eru ræktaðar í 14–21 dag við dauðhreinsaðar aðstæður í umhverfishólfi með birtu/myrkri á víxl í 16/8 klst. Ljósstyrkur er valinn af bilinu 100–150 μE m^{-2} s^{-1}. Hitastigið í prófunarkerjunum skal vera 23 ± 2 °C.

Þar eð breyttur Andrews-miðill inniheldur súkrósa (sem örvar vöxt þörunga, sveppa og baktería) skal tilreiðsla allra lausna prófunaríðefna og ræktun fara fram við dauðhreinsaðar aðstæður. Allir vökvar, sem og búnaður, eru dauðhreinsuð fyrir notkun. Dauðhreinsun fer fram með meðhöndlun með hituðu lofti (210 °C) í 4 klst. eða gufusæfingu í 20 mínútur við 121 °C. Auk þess fá allar flöskur, diskar, skálar o.s.frv. og annar búnaður logameðhöndlun á dauðhreinsuðu vinnuborði rétt fyrir notkun.

Sprotar eru fjarlægðir í hreinrækt úr forræktarflöskum og velja skal eins einsleitt efni og hægt er. Hver prófun útheimtir a.m.k. 60 prófunarlífverur (prófun með átta styrkleikum prófunaríðefnis). Taka skal nýjar hliðargreinar úr forræktum til prófunar, stytta þær í 2,5 cm frá neðsta hluta (mælt með kvarða) og flytja í bikarglas sem inniheldur dauðhreinsaðan breyttan Andrews-miðil. Hægt er að nota þessar nýju hliðargreinar í eiturhrifaprófun á *Myriophyllum spicatum án sets.*

Mynd 2

Plöntur skornar úr forrækt fyrir eiturhrifaprófunina á *Myriophyllum spicatum* án sets



C.51 **Eiturhrifaprófun á *Myriophyllum spicatum* í vatni og seti**

INNGANGUR

1. Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 239 um prófanir (2014). Til eru prófunaraðferðir fyrir fljótandi einkímblöðunga, vatnaplöntur af tegundinni *Lemna* (1. heimild), og fyrir þörungategundir (2. heimild). Þessar aðferðir eru venjulega notaðar til að safna gögnum til að fjalla um áhættu frá prófunaríðefnum, einkum íðefnum með verkun sem er illgresiseyðandi, á tegundir vatnaplantna sem er ekki marktegundir. Í sumum tilvikum kann þó að vera þörf á gögnum um fleiri tegundir fjölfrumuplantna. Í nýlegum birtum leiðbeiningum frá vinnufundi SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) um áhættumat á fjölfrumuplöntum í vatni m.t.t. varnarefna (*Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides* (AMRAP)) var lagt til að hægt væri að fara fram á gögn um fjölfrumuplöntutegundir með rætur í tengslum við prófunaríðefni með verkunarhátt sem vitað er að *Lemna* og þörungar eru ekki viðkvæm fyrir eða ef skipting í set er vandamál sem leiðir til váhrifa gegnum ræturnar. *Myriophyllum* spp. voru valdar sem ákjósanlegar tegundir, byggt á núverandi þekkingu og reynslu, í tilvikum þar sem farið er fram á gögn um rótfastar tegundir tvíkímblöðunga sem eru í kafi (4.–6. heimild). Þessi prófun kemur ekki í staðinn fyrir aðrar eiturhrifaprófanir í vatni; hún ætti fremur að koma þeim til viðbótar svo unnt sé að gera ítarlegra hættu- og áhættumat á vatnaplöntum. Prófunaraðferð í vatni og seti með *Myriophyllum spicatum* kemur til viðbótar við eiturhrifaprófun á *Myriophyllum spicatum* án sets (7. heimild).

2. Í þessu skjali er lýst prófunaraðferð sem gerir kleift að meta áhrif prófunaríðefnis á rótfastar vatnaplöntur af tegundinni *Myriophyllum spicatum* sem vaxa í vatns- og setkerfi. Prófunaraðferðin byggist að hluta til á aðferðum sem til eru (1., 2. og 8. heimild) og höfð er hliðsjón af nýlegri rannsókn sem tengist áhættumati á vatnaplöntum (3. heimild). Vatns- og setaðferðin hefur verið fullgilt með alþjóðlegri hringprófun sem gerð var með *Myriophyllum*-tegundum, sem voru ræktaðar við stöðug skilyrði, sem voru látnar komast í snertingu við prófunaríðefni með ísetningu gegnum vatnssúluna (9. heimild). Þó er auðvelt að aðlaga prófunarkerfið þannig að unnt sé að láta váhrifin verða með íbættu seti eða með vatnsfasanum í sviðsmyndum með hálfkyrrstöðu eða sviðsmyndum með púlsaðri skömmtun þó að þessar sviðsmyndir hafi ekki verið hringprófaðar formlega. Enn fremur er hægt að nota almennu aðferðina með öðrum rótföstum tegundum í kafi og tegundum sem eru að koma fram, þ.m.t. aðrar *Myriophyllum*-tegundir (t.d. *Myriophyllum aquaticum*) og *Glyceria maxima* (10. heimild). Það getur reynst nauðsynlegt að breyta prófunarskilyrðum, tilhögun og lengd fyrir aðrar tegundir. Einkum er þörf á frekari vinnu til að skilgreina viðeigandi verkferli fyrir *Myriophyllum aquaticum*. Þessum möguleikum er ekki lýst í smáatriðum í þessari prófunaraðferð en í henni er lýst staðlaðri aðferð við váhrif á *Myriophyllum spicatum* með vatnsfasanum í kyrrstöðukerfi.

3. Þessi prófunaraðferð hentar fyrir efni sem búið er að fullgilda prófunaraðferðina fyrir (sjá upplýsingar í hringprófunarskýrslunni (9. heimild)) eða fyrir samsetningar eða þekktar blöndur. Hægt er að framkvæma prófun á *Myriophyllum* til að uppfylla kröfur um gögn fyrir aðferðarþrep1 sem orsakast af hugsanlegri skiptingu prófunaríðefnis í set eða þáttum í tengslum við verkunarhátt/valvísi. Á sama hátt getur reynst þörf á að gera prófun á *Myriophyllum* á rannsóknarstofu, sem hluta af áætlun fyrir hærra aðferðarþrep, til að taka á vandamálum í tengslum við áhættu fyrir vatnaplöntur. Váhrifaleiðin (þ.e. með vatni eða seti) ákvarðast af tiltekinni ástæðu fyrir því að prófunin er framkvæmd. Áður en þessi aðferð til prófunar á blöndu, sem er framkvæmd í eftirlitsskyni, er notuð skal skoðað hvort, og þá af hverju, hún gæti veitt niðurstöður sem eru fullnægjandi í þeim tilgangi. Ekki er þörf á slíkri skoðun ef prófun á blöndunni er krafa af hálfu eftirlitsyfirvalda.

MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

4. Þessi prófun er ætluð til að meta áhrif af íðefnum á vöxt *Myriophyllum*-plantna sem vaxa í stöðluðum miðlum (vatni, seti og næringarefnum). Í þessu skyni er sprotaendum heilbrigðra plantna, sem blómgast ekki, plantað í staðlað gerviset, sem viðbótarnæringarefnum er bætt í til að tryggja fullnægjandi plöntuvöxt, og síðan viðhaldið í Smart- og Barko-miðli (1. viðbætir). Eftir bólfestutímabil, meðan ræturnar eru að myndast, eru plönturnar látnar verða fyrir váhrifum frá röð prófunarstyrkleika sem bætt er í vatnssúluna. Að öðrum kosti er hægt að líkja eftir váhrifum með seti með því að bæta prófunaríðefninu í gervisetið og gróðursetja plöntur í þetta íbætta set. Í báðum tilvikum er plöntunum síðan haldið við stýrð umhverfisskilyrði í 14 daga. Áhrif á vöxt eru ákvörðuð út frá megindlegu mati á lengd sprota, votvigt og þurrvigt, sem og eigindlegum athugunum á einkennum s.s. fölvasýki, drepi eða vaxtarafmyndun.

5. Til að magngreina áhrifin af íðefnum er vöxtur í prófunarlausnunum borinn saman við vöxt samanburðarplantna og styrkurinn, sem veldur tiltekinni x% vaxtarhindrun, er ákvarðaður og gefinn upp sem EC_x; „x“ getur verið hvaða gildi sem er, eftir því hvaða kröfur gilda samkvæmt reglum, t.d. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Tekið skal mið af því að mat á gildi EC_{10} and EC_{20} er einungis áreiðanlegt og viðeigandi í prófunum þar sem fráviksstuðlar í samanburðarplöntum lenda undir því áhrifagildi sem verið er að meta, þ.e. fráviksstuðlar skulu vera < 20% fyrir traust mat á EC_{20}.

6. Ákvarða skal bæði meðaltal sértæks vaxtarhraða (áætlað út frá mati á lengd sprotans, votvigt hans og þurrvigt) og afrakstur (metinn út frá aukningu á lengd sprotans, votvigt hans og þurrvigt) meðhöndlaðra og ómeðhöndlaðra plantna. Sértækur vaxtarhraði (r) og afrakstur (y) eru síðan notaðir til að ákvarða E_rC_x (t.d. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) og E_yC_x (t.d. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}), eftir því sem við á.

7. Ef þörf krefur má ákvarða tölfræðilega minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif út frá áætlun á meðaltali sértæks vaxtarhraða og afrakstri.

UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNARÍÐEFNIÐ

8. Greiningaraðferð með nægilegu næmi til að magnákvarða íðefnin í prófunarmiðlinum þarf að vera fyrirliggjandi.

9. Upplýsingar um prófunaríðefnið, sem geta verið gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, samsetning ef um er að ræða fjölþáttaefni, UVCB-efni, blöndur eða samsetningar, hreinleiki, vatnsleysni, stöðugleiki í vatni og ljósi, klofnunarfasti sýru (pK_a), deilistuðull oktanóls og vatns (K_{ow}), K_d fyrir set ef hann liggur fyrir, gufuþrýstingur og lífbrjótanleiki. Vatnsleysni og gufuþrýsting má nota til að reikna út fasta samkvæmt lögmáli Henrys en hann sýnir líkindin á umtalsverðu tapi prófunaríðefnisins meðan á prófuninni stendur. Ef líklegt er að prófunaríðefni tapist skal magngreina það sem tapast og skjalfesta skal næstu áfanga til að takmarka slíkt tap. Ef upplýsingar um leysni og stöðugleika prófunaríðefnisins eða -íðefnanna eru óljósar er mælt með því að þessir eiginleikar séu metnir við prófunarskilyrði, þ.e. vaxtarmiðill, hitastig og lýsingarskilyrði sem verða í prófuninni. *Athugasemd:* við prófun á ljósháðum peroxandi illgresiseyðum skal lýsingin sem er notuð á rannsóknarstofunni innihalda jafngildi útfjólublás ljóss sem finnst í sólarljósi í náttúrunni.

10. Mæla skal sýrustig og aðlaga það í prófunarmiðlinum eins og við á. Það er sérstaklega mikilvægt að stjórna sýrustigi prófunarmiðilsins, t.d. við prófanir á málmum eða íðefnum sem eru óstöðug fyrir vatnsrofi. Frekari leiðbeiningar um prófun á íðefnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina er að finna í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (11. heimild).

GILDI PRÓFUNARINNAR

11. Til að prófunarniðurstöður teljist gildar skal meðaltal heildarlengdar sprota og meðaltal heildarvotvigtar sprota í samanburðarplöntum a.m.k. tvöfaldast meðan váhrifafasi prófunarinnar stendur yfir. Þar að auki mega samanburðarplöntur ekki sýna nein sýnileg einkenni fölvasýki og skulu vera sýnilega lausar við mengun frá öðrum lífverum, s.s. þörunga og/eða bakteríulög á plöntunum, á yfirborði setsins og í prófunarmiðlinum.

12. Meðalgildi fráviksstuðuls fyrir afrakstur, sem byggist á mælingum á votvigt sprota (þ.e. frá upphafi prófunar til loka hennar) í samanburðarræktunum, fer ekki yfir 35% milli samhliða prófana.

VIÐMIÐUNARÍÐEFNI

13. Viðmiðunaríðefni, s.s. 3,5-díklórófenól sem er notað í hringprófuninni (9. heimild), skal/skulu prófuð reglulega til að kanna framkvæmd prófunaraðferðarinnar yfir lengri tíma. Gögn úr hringprófun benda til þess að meðaltal EC_{50}-gilda 3,5-díklórófenóls fyrir mismunandi svarbreytur sé á bilinu 4,7 og 6,1 mg/l (sjá upplýsingar í hringprófunarskýrslunni um öryggisbil sem búist er við kringum þessi gildi). Mælt er með því að prófa viðmiðunaríðefni a.m.k. tvisvar á ári eða, ef prófanir eru gerðar óreglulega, samhliða endanlegum eiturhrifaprófunum. Leiðbeiningar um væntanlegt EC_{50}-gildi 3,5-díklórófenóls er að finna í tölfræðilegri skýrslu um alþjóðlegu hringprófunina (9. heimild).

LÝSING Á AÐFERÐINNI

Prófunarbúnaður

14. Prófunin skal fara fram við stýrð umhverfisskilyrði, þ.e. í ræktunarklefa, ræktunarherbergi eða á rannsóknarstofu, með stýrðri lengd dags, lýsingu og hitastigi (sjá hlutann „Prófunarskilyrði“, 56.–58. liður). Stofnræktum skal haldið aðskilið frá prófunarkerjum.

15. Rannsóknin skal framkvæmd með því að nota prófunarílát úr gleri, s.s. ker eða bikarglös; alla jafna eru notuð 2 l bikarglös úr gleri (u.þ.b. 24 cm á hæð og 11 cm að þvermáli). Þó geta önnur ílát (þ.e. stærri) hentað, að því tilskildu að vatnið sé nógu djúpt til að vöxtur sé óheftur og plönturnar haldist á kafi meðan prófunin stendur yfir.

16. Nota má blómapotta úr gleri eða plasti (u.þ.b. 9 cm að þvermáli, 8 cm á hæð og 500 ml að rúmmáli) sem ílát til að gróðursetja plönturnar í setið. Að öðrum kosti má nota bikarglös úr gleri og þau eru ákjósanlegri í sumum tilvikum (t.d. til að prófa vatnsfælin íðefni eða íðefni með háan K_{ow}).

17. Val á stærð potts/bikarglass verður að taka mið af vali á prófunarkerjum og tilhögun prófunar sem valin er (sjá hér á eftir). Ef prófunartilhögun A er notuð (einn sproti í hverjum potti og þrír pottar í hverju keri) er e.t.v. þörf á minni pottum eða stærri kerjum. Ef prófunartilhögun B er notuð (þrír sprotar í hverjum potti og einn pottur í hverju keri) ætti tilgreindur pottur og stærð kers að vera fullnægjandi. Í öllum tilvikum ætti dýpt yfirliggjandi vatns að vera a.m.k. 12 cm yfir yfirborði setsins og skrá skal hlutfall yfirborðsflatar sets/rúmmáls og yfirborðsflatar vatns/rúmmáls.

Prófunarlífvera

18. Hægt er að nota almennu aðferðina, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, til að prófa ýmsar tegundir vatnaplantna. Þó hafa skilyrðin, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, verið sniðin að prófunum á tegundinni *Myriophyllum spicatum* af mararætt. Þessi tegund tilheyrir ætt tvíkímblöðunga, Haloragaceae.

19. *Myriophyllum spicatum* (vatnamari) er rótföst tegund, sem er í kafi, sem þolir ýmiss konar aðstæður og finnst bæði í kyrrstæðu vatni og straumvatni. *M. spicatum* er fjölær jurt og einungis ræturnar lifa yfir veturinn. Reglan er að plöntur blómgast og bera fræ en kynlaus fjölgun frá blaðaxlarbrumum eða stilkhlutum, sem losna á náttúrulegan hátt eða vegna rasks, er oftast meginaðferðin þegar tegund nemur nýtt land.

Ræktun prófunarlífveru

20. Hægt er að fá plöntur af náttúrulegum stofnum eða með milligöngu vatnaplöntubirgja. Í báðum tilvikum skal skjalfesta uppruna plantnanna og staðfesta skal sanngreiningu á tegundum. Þess skal sérstaklega gætt að tryggja að rétt tegund fáist þegar *Myriophyllum spicatum* er tekinn úr náttúrunni, einkum á svæðum þar sem hann getur blandast öðrum *Myriophyllum*-tegundum. Í vafatilvikum er mælt með að nota sanngreindar rannsóknarstofuræktanir af þekktum uppruna. Ekki skal nota plöntur, sem hafa orðið fyrir váhrifum frá mengandi íðefnum eða sem hafa verið teknar af svæðum sem vitað er að eru menguð, í þessa prófun.

21. Á svæðum þar sem *M. spicatum* er ekki auðfáanlegur yfir vetrarmánuðina getur reynst nauðsynlegt að viðhalda stofnræktum til lengri tíma í gróðurhúsum eða við rannsóknarstofuskilyrði. Stofnræktum skal viðhaldið við skilyrði sem eru svipuð og prófunarskilyrðin en þó má draga úr styrk ágeislunar og hitastigi til að draga úr vinnu við viðhald ræktа (t.d. þegar prófanir með *Myriophyllum* eru ekki áætlaðar um tíma). Mælt er með því að nota stærri ker og blómapotta en eru notaðir í prófunum til að hafa pláss fyrir fjölgun. Set og samsetning með vatni og miðli skulu vera þau sömu og notuð eru í prófunum þó að nota megi annars konar aðferðir við áburð í set (t.d. notkun á áburðarsamsetningum með hægvirka losun, sem fást á almennum markaði).

22. Stofnplöntur skulu vera sjáanlega lausar við mengun frá öðrum lífverum, þ.m.t. sniglar, þráðkenndir þörungar, sveppir og skordýr, t.d. egg eða lirfur náttfiðrildisins *Paraponyx stratiotata* og lirfur eða fullvaxin dýr af ranabjöllutegundinni *Eubrychius velutus*. Það getur reynst nauðsynlegt að hreinsa plöntuefni í ferskvatni til að stemma stigu við sýnilegri mengun. Þar að auki skal leitast við að lágmarka myndun einfruma þörunga og bakteríumengun þó að ekki sé nauðsynlegt að dauðhreinsa plöntuefnið algerlega. Vakta skal stofnræktir og umplanta þeim eins og þörf krefur til að forðast myndun þörunga og bakteríumengun. Loftun stofnrækta getur komið að gagni ef þörunga- eða bakteríumengun verður til vandræða.

23. Í öllum tilvikum eru plöntur ræktaðar/aðlagaðar við skilyrði sem eru svipuð en ekki endilega nákvæmlega eins og þau sem notuð eru í prófuninni í nægilega langan tíma (þ.e. 2 vikur) áður en þær eru notaðar í prófun.

24. Ekki skal nota stofnræktir sem blómgast í prófun þar eð vaxtarhraði plantna minnkar alla jafna meðan á blómgun stendur og eftir hana.

Set

25. Mælt er með notkun á eftirfarandi samsettu seti, að stofni til úr gerviseti sem er notað í kafla C.28 í þessum viðauka (8. heimild), í þessari prófun. Setið er tilreitt eins og lýst er í prófunaraðferð C.28, að undanskilinni íblöndun næringarefna eins og lýst er hér á eftir:

    a) 4–5% mór (þurrvigt, í samræmi við 2 ± 0,5% lífrænt kolefni), eins nálægt pH-gildinu 5,5 til 6,0 og mögulegt er; mikilvægt er að nota mó í duftformi, fínmalaðan (helst með kornastærð < 1 mm) og einungis loftþurrkaðan.

    b) 20% (þurrvigt) kaólínleir (kaólínítinnihald helst yfir 30%).

    c) 75–76% (þurrvigt) kvarssandur (mest skal vera af fínum sandi þar sem yfir 50% af ögnunum er á bilinu 50–200 μm).

    d) Vatnskenndum næringarefnamiðli er bætt við þannig að innihald bæði ammóníumklóríðs og natríumfosfats í endanlegri framleiðslulotu sets sé 200 mg/kg af þurru seti og að rakainnihald endanlegu blöndunnar sé á bilinu 30–50%.

    e) Kalsíumkarbónati af efnafræðilegum hreinleika ($CaCO_3$) er bætt við til að stilla pH-gildið í lokablöndu setsins í 7,0 ± 0,5.

26. Uppspretta mós, kaólínleirs og sands skal þekkt og skjalfest. Ef uppruninn er óþekktur eða veldur einhverjum áhyggjum skal athuga hvort efnamengun sé nokkuð til staðar í viðkomandi efnisþáttum (t.d. þungmálmar, lífræn klórsambönd, lífræn fosfórsambönd).

27. Blanda skal þurrum efnisþáttum setsins saman í einsleita blöndu áður en næringarefnavatnslausninni er blandað vandlega við setið. Rakt setið skal tilreitt a.m.k. tveimur dögum fyrir notkun til að mórinn geti gegnblotnað og til að koma í veg fyrir að vatnsfælnar móagnir fljóti upp á yfirborðið þegar miðillinn er settur yfir setið; geyma má rakt set í myrkri fyrir notkun.

28. Fyrir prófun er setið flutt í ílát af hentugri stærð, t.d. blómapotta af þvermáli sem passar í glerílátin (yfirborðsflötur setsins ætti að hylja u.þ.b. 70% eða meira af yfirborðsfleti ílátsins). Í tilvikum þar sem er gat á botni ílátsins hjálpar síupappír á botni ílátsins til við að halda setinu í ílátinu. Pottarnir eru fylltir þannig með setinu að yfirborð setsins sé slétt áður en það er hulið með þunnu lagi (~ 2 til 3 mm) af hvarftregu efni, s.s. sandi, fíngerðri gróðurmöl (e. *horticultural grit*) (eða muldum kóröllum) til að halda setinu á sínum stað.

Prófunarmiðill

29. Mælt er með Smart- og Barko-miðli (12. heimild) til ræktunar og prófunar á *Myriophyllum spicatum*. Tilreiðslu á þessum miðli er lýst í 1. viðbæti. pH-gildi miðilsins (vatnsfasi) við upphaf prófunar skal vera á bilinu 7,5 til 8,0 fyrir hámarksvöxt plantnanna.

Tilhögun tilraunar

30. Í prófuninni skal nota a.m.k. sex samhliða prófunarker fyrir ómeðhöndlaðan samanburð og a.m.k. fjögur samhliða prófunarker fyrir hvert styrkleikastig, að lágmarki 5 styrkleikastig.

31. Ef ekki er þörf á ákvörðun þess styrks sem hefur engin merkjanleg áhrif má breyta prófunaráætlun þannig að styrkleikastigum sé fjölgað og samhliða prófunum á hverju styrkleikastigi fækkað.

32. Fyrir hvert prófunarker er ein samhliða prófun sem inniheldur þrjá sprota. Fyrir hendi eru tveir valkostir til að rækta þrjá sprota í hverju prófunarkeri:

— Prófunartilhögun A: einn sproti í hverjum potti og þrír pottar í hverju keri.

— Prófunartilhögun B: þrír sprotar í hverjum potti og einn pottur í hverju keri.

— Annars konar tilhögun prófunar með einum sprota í hverjum potti í hverju prófunarkeri er ásættanleg, að því tilskildu að samhliða prófanir séu aðlagaðar eins og þörf krefur til að ná tilskildum gildisviðmiðunum.

33. Raða skal prófunarkerjunum í meðferðarhópana af handahófi. Til að lágmarka rúmfræðilegan mun á ljósstyrk eða hitastigi er nauðsynlegt að nota handahófskennda tilhögun við að staðsetja prófunarkerin á prófunarsvæðinu.

Styrkleikar prófunaríðefna og samanburðarhópar

34. Að jafnaði skulu styrkleikar fylgja jafnhlutfallaröð; stuðullinn sem greinir á milli prófunarstyrkleikana skal ekki fara yfir 3,2. Fyrirliggjandi þekking á eiturhrifum prófunaríðefnisins úr skammtastærðarprófun kemur að gagni við að velja hæfilega prófunarstyrkleika.

35. Til að tryggja viðeigandi öryggismörk skal EC_x-gildið, sem ákvarðað er, liggja innan prófunarstyrkleikanna. Ef t.d. er verið að meta EC_{50} skal hæsti prófunarstyrkleikinn vera hærri en EC_{50}-gildið. Ef EC_{50}-gildið er utan við röð prófunarstyrkleikanna verða viðkomandi öryggisbil stór og því verður hugsanlega ekki unnt að meta tölfræðileg mátgæði líkansins á traustan hátt. Notkun á fleiri prófunarstyrkleikum mun bæta öryggisbilið kringum EC_x-gildið sem af þessu leiðir.

36. Til að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif/styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif (valkvæður endapunktur) skal lægsti prófunarstyrkurinn vera nægilega lítill til að vöxturinn verði ekki verulega frábrugðinn vexti samanburðarplantna. Auk þess skal mesti prófunarstyrkurinn vera nógu mikill til að vöxtur sé marktækt minni en í samanburðarprófuninni. Notkun á fleiri samhliða prófunum eykur tölfræðilegan styrk styrksins sem hefur engin áhrif/dreifnigreiningartilhögunarinnar.

Markprófun

37. Í tilvikum þar sem skammtastærðarprófun bendir til þess að prófunaríðefnið hafi engin skaðleg áhrif við styrk að 100 mg/l eða að leysnimörkum sínum í prófunarmiðlinum, eða, ef um er að ræða samsetningu sem er allt að því við dreifanleikamörk sín, má gera markprófun til að auðvelda samanburð svörunar í samanburðarhópi og einum meðferðarhópi — 100 mg/l eða styrk sem er jafn leysnimörkum eða 1 000 mg/kg af þurru seti. Þessi prófun skal fylgja almennum meginreglum um staðlaða skammtasvörunarprófun að því undanskildu að ráðlagt er að auka lágmarksfjölda samhliða prófana í sex prófunarker á hvern samanburð og styrkleika. Greina má vöxt í samanburðar- og meðferðarhópnum með tölfræðiprófi til að bera saman meðaltöl, t.d. t-prófi.

Prófunarlausnir

38. Prófunarlausnir eru alla jafna tilreiddar með því að þynna stofnlausn, sem er tilreidd með því að leysa prófunaríðefnið upp eða dreifa því í Smart- og Barko-miðil með því að nota steinefnasneytt (þ.e. eimað eða afjónað) vatn (sjá 1. viðbæti).

39. Hæsti prófunarstyrkur skal alla jafna ekki fara yfir vatnsleysni prófunaríðefnisins eða, ef um er að ræða samsetningar, dreifanleika við prófunarskilyrði.

40. Að því er varðar prófunaríðefni sem hafa litla vatnsleysni getur reynst nauðsynlegt að útbúa sterka stofnlausn eða dreifilausn íðefnisins með því að nota lífrænan leysi eða dreifiefni til þess að auðveldara sé að bæta réttu magni prófunaríðefnisins í prófunarmiðilinn og bæta dreifingu þess og uppleysingu. Forðast skal notkun slíkra leysa eða dreifiefna í lengstu lög. Notkun hjálparleysa eða dreifiefna má ekki hafa í för með sér eiturhrif fyrir plöntur. Aseton og dímetýlformamíð eru dæmi um leysa sem eru almennt notaðir og eru ekki eitraðir fyrir plöntur í styrk að 100 µl/l. Ef leysir eða dreifiefni eru notuð skal gera grein fyrir lokastyrk þess og honum haldið í lágmarki (≤ 100 µl/l). Við þessar aðstæður skulu allir meðferðar- og samanburðarhópar (leysir) innihalda sama styrk leysis eða dreifiefnis. Ómeðhöndlaður samhliða samanburður sem inniheldur hvorki leysi né dreifiefni er einnig tekinn með í tilhögun prófunar. Frekari leiðbeiningar um notkun dreifiefna eru gefnar í leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (11. heimild).

PRÓFUNARAÐFERÐ

41. Prófunaraðferðin er breytileg eftir íkomuleið prófunaríðefnisins (þ.e. með vatns- eða setfasanum). Hafa skal í huga líklega hegðun prófunaríðefnisins í vatns- og setkerfi við val á því váhrifafyrirkomulagi sem er notað í prófuninni (þ.e. kyrrstaða eða kyrrstaða með endurnýjun, íbætt vatn eða íbætt set). Prófanir með íbættu seti geta í sumum tilvikum verið ákjósanlegri fyrir íðefni sem spáð er að skiptist umtalsvert í set.

Bólfestufasi

42. Heilbrigðir sprotaendar/-toppar, þ.e. án hliðargreina, eru skornir af ræktunarplöntunum þannig að lengd sprota verði 6 cm (± 1 cm). Við prófunartilhögun A (einn sproti í hverjum potti og þrír pottar í hverju keri) er einum sprotatoppi plantað í hvern pott. Við prófunartilhögun B (þrír sprotar í hverjum potti og einn pottur í hverju keri) er fjórum til fimm sprotaendum plantað í hvern pott sem inniheldur setið.

43. Í báðum tilvikum ætti að planta í umframpotta til að unnt sé að velja svipaðar plöntur við upphaf prófunar, sem og til að fá varaplöntur til að nota við skoðun á rótarvexti rétt fyrir meðferð og varaplöntur sem eru uppskornar m.t.t. lífmassa sprota og lengdarmælinga á degi 0.

44. Sprotarnir eru settir niður þannig að u.þ.b. þrír cm, sem hylja a.m.k. tvö stönguliðamót, séu undir yfirborði setsins.

45. Síðan eru pottarnir fluttir í prófunarkerin við sömu umhverfisaðstæður og eru í váhrifafasanum og hafðir í Smart- og Barko-miðli í sjö daga til að örva rótarmyndun.

46. Eftir þennan tíma skal fjarlægja nokkrar plöntur í varapottum til að skoða rótarvöxt. Ef rótarvöxtur er ekki sjáanlegur (þ.e. rótartoppar eru ekki sjáanlegir) skal lengja bólfestufasann þangað til rótarvöxtur er orðinn sjáanlegur. Mælt er með þessum áfanga til að tryggja að plönturnar séu í góðum vexti þegar prófunin hefst.

Val á svipuðu plöntuefni

47. Við prófunartilhögun A (einn sproti í hverjum potti og þrír pottar í hverju keri) eru pottarnir valdir m.t.t. einsleitni áður en prófun hefst. Við prófunartilhögun B (þrír sprotar í hverjum potti og einn pottur í hverju keri) eru umframplöntur fjarlægðar þannig að eftir verði þrjár plöntur sem eru svipaðar að því er varðar stærð og útlit.

Váhrif með vatnsfasa

48. Pottar, sem eru valdir m.t.t. einsleitni, eru settir í prófunarkerin eins og krafist er í tilhögun tilraunar. Síðan er Smart- og Barko-miðli bætt í prófunarkerin. Þess skal gætt að forðast að raska setinu. Í þessu skyni má bæta miðlinum við með því að nota trekt eða plastskífu til að hylja setið meðan miðlinum er hellt í prófunarkerin, að því tilskildu að diskurinn sé fjarlægður strax þar á eftir. Að öðrum kosti má setja blómapottana í prófunarkerin eftir að miðlinum hefur verið bætt við. Í báðum tilvikum má nota nýjan miðil við upphaf váhrifafasans, ef nauðsyn krefur, til að lágmarka mögulega myndun þörunga og baktería eða til að unnt sé að tilreiða stakar framleiðslulotur prófunarlausna í öllum samhliða prófunum.

49. Lengd sprota ofan við setið er mæld, annað hvort fyrir eða eftir að miðlinum er bætt við.

50. Bæta má viðeigandi magni prófunaríðefnisins í prófunarmiðilinn áður en honum er bætt í prófunarkerin. Að öðrum kosti má setja prófunaríðefnið í miðilinn eftir að honum er bætt í prófunarkerin. Í því tilviki skal þess gætt að tryggja að dreifni prófunaríðefnisins sé einsleit í prófunarkerfinu án þess að setinu sé raskað.

51. Í öllum tilvikum er útlit (t.d. tært, skýjað, o.s.frv.) prófunarmiðilsins skráð við upphaf prófunarinnar.

Váhrif með seti

52. Íbætt set af þeim styrk sem valinn er eru tilreidd með því að bæta lausn af prófunaríðefninu beint í nýtt set. Stofnlausn prófunaríðefnisins, sem er uppleyst í afjónuðu vatni, er blandað við samsetta setið með veltikvörn, fóðurblandara eða handvirkt. Ef prófunaríðefnið er torleysanlegt í vatni er hægt að leysa það upp í eins smáum skömmtum og unnt er í hentugum, lífrænum leysi (t.d. hexani, asetoni eða klóróformi). Síðan er þessi lausn blönduð með ca 10 g af fínum kvarssandi í eitt tilraunaílát. Leysirinn er látinn gufa upp og síðan er sandurinn blandaður með hæfilegu magni af seti í hvert bikarglas. Einungis er hægt að nota efni sem gufa auðveldlega upp til að leysa prófunaríðefnið upp, dreifa því eða ýra. Hafa skal í huga að taka verður tillit til rúmmáls/þyngdar sandsins, sem prófunarefninu er bætt í, við endanlega tilreiðslu á setinu (þ.e. af þeim sökum skal nota minni sand við tilreiðslu á setinu). Þess skal gætt að tryggja að prófunaríðefninu, sem er bætt við setið, sé dreift vandlega og jafnt í setið.

53. Íbætta setið er sett í pottana (eins og lýst er hér að framan). Plöntur, sem eru valdar m.t.t. einsleitni og fullnægjandi rótarkerfi, eru teknar úr pottunum sem eru notaðir í bólfestufasanum og þeim umplantað í íbætta setið eins og lýst er hér að framan.

54. Pottarnir eru settir í prófunarkerin eins og krafist er í tilhögun tilraunar. Smart- og Barko-miðli er síðan bætt varlega við (þ.e. með því að nota trekt) til að forðast að raska setinu. Lengd sprota ofan við setið er mæld, annað hvort fyrir eða eftir að miðlinum er bætt við.

Vatnshæð viðhaldið meðan prófun stendur yfir

55. Skrá skal endanlegt vatnsmagn og merkja vatnshæðina á hverju prófunarkeri. Ef vatn, sem nemur meira en 10%, gufar upp meðan prófun stendur yfir skal stilla vatnshæðina með eimuðu vatni. Ef nauðsyn krefur má hylja bikarglös lauslega með gagnsæju loki, t.d. gagnsæjum plastlokum, til að lágmarka uppgufun og mengun frá þörungagróum.

Prófunarskilyrði

56. Notuð er hlý og/eða svöl, hvít flúrlýsing til að veita ágeislunarstyrk ljóss á bilinu u.þ.b. 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$ á mældri, virkri bylgjulengd ljóstillífunar (400–700 nm) við vatnsyfirborðið og notuð birtu- og myrkvunarhringrás með 16 klst. birtu og 8 klst. myrkur. Mismunur á völdum ágeislunarstyrk ljóss á prófunarsvæðinu skal ekki fara yfir ± 15%.

57. Hitastigið í prófunarkerjunum er 20 ± 2 °C.

58. pH-gildi samanburðarmiðilsins skal ekki hækka meira en sem nemur 1,5 einingum meðan á prófun stendur. Frávik sem er yfir 1,5 einingum myndi þó ekki gera prófunina ógilda ef hægt er að sýna fram á að áður tilgreindar gildisviðmiðanir séu uppfylltar.

Lengd prófunar

59. Váhrifatímabilið er 14 dagar.

Mælingar og ákvarðanir með greiningum

60. Eftir bólfestufasa og rétt fyrir meðferð (þ.e. á degi 0) eru varaplöntur úr fimm pottum, sem eru valdir af handahófi úr tilhöguninni með þremur plöntum í hverjum potti eða úr tilhöguninni með 15 pottum þar sem er ein planta í hverjum potti, teknar til að meta lengd sprota og vot- og þurrvigt eins og lýst er hér á eftir.

61. Að því er varðar plöntur sem eru fluttar yfir í váhrifafasann eru eftirfarandi möt framkvæmd eins og sýnt er í töflu 1:

— Mat á lengd aðalsprotans, fjölda hliðarsprota og lengd hliðarsprota er skráð a.m.k. við lok váhrifatímabilsins (t.d. á 14. degi).

— Sjónrænt mat á plöntuheilbrigði er skráð a.m.k. þrisvar meðan váhrifatímabilið stendur yfir (t.d. á 0., 7. og 14. degi).

— Mat á vot- og þurrvigt sprota er gert við lok prófunar (þ.e. á 14. degi).

62. Lengd sprota er ákvörðuð með því að nota kvarða. Ef hliðarsprotar eru fyrir hendi skal einnig telja fjölda þeirra og mæla lengdina.

63. Sjónrænt mat á plöntuheilbrigði er gert með því að skrá útlit plantna og almennt ástand prófunarmiðilsins. Athuganir, sem á að skrá, eru m.a.:

— Drep, fölvasýki eða annar óeðlilegur litur, t.d. mikill roði miðað við samanburðarplönturnar.

— Myndun bakteríu- eða þörungamengunar.

— Frávik í vexti, t.d. kyrkingur, breytt lengd stönguliða, afmyndaðir sprotar/laufblöð, fjölgun hliðarsprota, laufmissir, tap á safaspennu og stilkur skiptir sér.

— Sjónrænt mat á heilbrigði róta fer fram við lok prófunar með því að skola setið varlega af rótunum svo unnt sé að skoða rótarkerfið. Tillaga að kvarða fyrir mat, sem á við um samanburðarplöntur, er sýnd hér á eftir:

1) rætur vantar,

2) fáar rætur,

3) rótarmyndun er í meðallagi,

4) rótarmyndun er mjög góð, svipuð og í samanburðinum.

64. Mat á votvigt fer fram við upphaf og lok prófunar með því að skera sprotann af við setlagið og þerra hann fyrir vigtun. Þess skal gætt að fjarlægja setagnir sem geta loðað við neðsta hluta sprotans. Sprotaefniviðurinn er síðan settur í hitaskáp við ca 60 °C og þurrkaður í stöðuga þyngd áður en hann er vigtaður aftur og þurrvigtin skráð

65. Samantekt á líffræðilegu lágmarksmati, sem krafist er meðan prófunin stendur yfir, er að finna í töflu 1.

Tafla 1

Matsáætlun

Dagur eftir meðferð (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Lengd sprota, lengd hliðarsprota og fjöldi	Sjónrænt mat á sprotum	Vot- og þurrvigt sprota Sjónrænt mat á rótum	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: bendir til þess að þörf sé á mati í þessum tilvikum

—: bendir til þess að ekki sé þörf á mælingum.

Tíðni mælinga og ákvarðana með greiningum

66. Hitastigið í miðlinum í viðbótarkeri, sem er haft við sömu skilyrði í ræktunarklefanum, ræktunarkassanum eða herberginu, skal skráð a.m.k. einu sinni á dag (eða stöðugt með gagnaskráningartæki).

67. Mæla skal sýrustig og styrk uppleysts súrefnis í prófunarmiðlinum í öllum ílátum samhliða prófunar við upphaf prófunar, a.m.k. einu sinni meðan rannsóknin stendur yfir og við lok hennar. Gera skal mælingarnar á sama tíma dagsins í hvert skipti. Ef magnlausnir (e. *bulk solution*) eru notaðar til að tilreiða allar samhliða prófanir með hverjum prófunarstyrk er ásættanlegt að gera eina mælingu á hverri magnlausn á degi 0.

68. Mæla skal styrk ágeislunar í ræktunarklefanum, ræktunarkassanum eða herberginu við punkta sem samsvara hæð vatnsyfirborðsins. Mælingar skulu gerðar a.m.k. einu sinni við upphaf prófunar eða meðan á prófuninni stendur. Aðferðin við ljósgreiningu og ljósmælingu hefur áhrif á mæligildið, sérstaklega tegund nemans. Æskilegra er að nota kúlulaga nema (sem nema ljós frá öllum hornum fyrir ofan og neðan mæliflötinn) og hvelfda (kósínus) nema (sem nema ljós frá öllum hornum fyrir ofan mæliflötinn) en einstefnunema og það gefur hærri niðurstöður fyrir dreifða ljósgjafa eins og lýst er hér.

Mælingar vegna greiningar á prófunaríðefni

69. Gera skal greiningarmælingar á styrk prófunaríðefnis til stuðnings því að prófunaríðefnið sé notað á réttan hátt.

70. Að því er varðar alla prófunarstyrkleika skal safna vatnssýnum til greiningar á prófunaríðefni skömmu eftir að prófun hefst (þ.e. á þeim degi sem stöðug íðefni eru notuð eða klukkustund eftir að óstöðug íðefni eru notuð) og við lok prófunar.

71. Ákvarða skal styrkleika í seti og gropuvatni sets við upphaf prófunar og við lok hennar, a.m.k. að því er varðar hæsta prófunarstyrkinn, nema vitað sé að prófunaríðefnin eru stöðug í vatni (> 80% af nafnstyrk). Vera má að mælingar í seti og gropuvatni séu ekki nauðsynlegar ef skipting prófunaríðefnisins milli vatns og sets hefur verið ákvörðuð með skýrum hætti í vatns- og setrannsókn við sambærileg skilyrði (t.d. hlutfall sets og vatns, notkunaraðferð, tegund sets).

72. Líklegt er að taka sýna úr seti við upphafi prófunar raski prófunarkerfinu. Því getur verið þörf á meðhöndluðum prófunarkerjum til viðbótar til að auðvelda ákvarðanir með greiningum við upphaf prófunar og við lok hennar. Að sama skapi, ef talið er nauðsynlegt að gera millimat, þ.e. á degi 7, og nota þarf stór sýni af seti í greininguna, sem ekki er auðvelt að fjarlægja úr prófunarkerfinu, skal gera ákvarðanir með greiningum með því að nota viðbótarprófunarker sem eru meðhöndluð á sama hátt og þau sem eru notuð í líffræðileg möt.

73. Mælt er með skiljun, t.d. við 10 000 g og 4 °C í 30 mínútur, til að einangra millivatn. Ef sýnt er að prófunaríðefnið ásogast ekki við síur getur þó síun einnig verið hentug. Í sumum tilvikum er ef til vill ekki mögulegt að greina styrk í gropuvatni ef sýnið er of lítið.

74. í kyrrstöðuprófunum (þ.e. váhrif með vatnsfasa), ef ekki er búist við að styrkur viðkomandi prófunaríðefnis eða -íðefna haldist innan við 20% af nafnstyrk meðan prófunin stendur yfir án þess að prófunarlausnin sé endurnýjuð, skal taka sýni úr notuðum og nýtilreiddum prófunarlausnum til að greina styrk prófunaríðefnisins við hverja endurnýjun.

75. Í tilvikum þar sem mældur upphafsstyrkur prófunaríðefnis liggur utan við 20% af nafnstyrk en sýna má fram á endurtekningarnákvæmni og stöðugleika upphaflegs styrkleika (þ.e. innan markanna 80–120% af upphaflegum styrkleika), þarf þó ekki að gera efnafræðilegar ákvarðanir nema á hæsta og lægsta styrk.

76. Í öllum tilvikum þarf ákvörðun á styrkleikum prófunaríðefnis aðeins að fara fram í einu samhliða prófunaríláti fyrir hvern prófunarstyrk. Að öðrum kosti má hópa prófunarlausnir til greiningar úr öllum samhliða prófunum fyrir hvern styrk.

77. Ef unnt er að sýna fram á að styrkur prófunaríðefnis hafi haldist innan 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni er heimilt að greining á niðurstöðunum og því næst útleiðsla á endapunktum grundvallist hvort heldur sem er á nafngildum eða mældum upphafsgildum.

78. Í þessum tilvikum skal hrifstyrkur byggjast á nafnstyrkleikum eða mældum styrkleikum í vatninu í upphafi prófunarinnar.

79. Ef unnt er að sýna fram á að styrkurinn hafi minnkað (þ.e. helst ekki innan 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í meðhöndlaða hólfinu) í allri prófuninni skal greining á niðurstöðum þó byggjast á faldmeðaltali styrks meðan á váhrifum stendur eða á líkönum sem lýsa lækkun á styrk prófunaríðefnisins í meðhöndlaða hólfinu (11. heimild).

MAT Á GÖGNUM

80. Í tilvikum þar sem nota þarf leysi/dreifiefni má hópa gögn úr samanburði með leysi og ómeðhöndluðum samanburði til tölfræðilegrar greiningar, að því tilskildu að ekki sé tölfræðilega marktækur munur á svörun í samanburði með leysi og ómeðhöndluðum samanburði.

Svarbreytur

81. Tilgangur prófunarinnar er að ákvarða áhrif prófunaríðefnis á vöxt prófunartegunda með því að nota tvær svarbreytur, meðaltal sértæks vaxtarhraða og afrakstur með eftirfarandi hætti:

Meðaltal sértæks vaxtarhraða

82. Þessi svarbreyta byggir á breytingum á logrum heildarlengdar sprota, heildarvotþyngdar sprota og heildarþurrþyngdar sprota yfir lengri tíma í samanburðarhópunum og í hverjum meðferðarhópi. Þessi breyta er reiknuð út fyrir hverja samhliða prófun fyrir hvern samanburðar- og meðferðarhóp. Reikna skal út meðallengd og -þyngd plantnanna þriggja í hverju prófunarkeri (samhliða prófun) og síðan vaxtarhraða í hverri samhliða prófun með því að nota eftirfarandi formúlu:

$$\mu_{j-i} = \frac{In(N_j) - In(N_j)}{t}$$

þar sem:

μ_{i-j}: er meðaltal sértæks vaxtarhraða frá tímanum i til j

N_i: er mælibreyta í prófunar- eða samanburðarkeri á tímanum i

N_j: er mælibreyta í prófunar- eða samanburðarkeri á tímanum j

t: er tímabilið frá i til j

83. Reikna skal út meðalgildi vaxtarhraða ásamt dreifnimati fyrir hvern meðferðar- og samanburðarhóp út frá svörun hverrar samhliða prófunar.

84. Reikna skal meðaltal sértæks vaxtarhraða fyrir allt prófunartímabilið (tíminn „i“ í formúlunni hér á undan er upphaf prófunarinnar og tíminn „j“ er lok prófunarinnar). Reiknað er út meðalgildi fyrir meðaltal sértæks vaxtarhraða ásamt dreifnimati fyrir hvern prófunarstyrk og samanburðarprófun.

85. Hlutfall hindrunar á vaxtarhraða (I_r) á hverju styrkleikastigi prófunarefnis (meðferðarhópur) er reiknaður með eftirfarandi formúlu:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

þar sem:

% Ir: er hlutfall hindrunar í meðaltali sértæks vaxtarhraða

μC: er meðalgildi μ í samanburðarprófuninni

μT: er meðalgildi μ í meðferðarhópnum

Afrakstur

86. Þessi svarbreyta byggir á breytingum á heildarlengd sprota, heildarvotþyngd sprota og heildarþurrþyngd sprota yfir lengri tíma í samanburðarhópunum og í hverjum meðferðarhópi. Hægt er að reikna út meðalhundraðshlutfall hindrunar á afrakstri (% Iy) fyrir hvern meðferðarhóp með eftirfarandi hætti:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

þar sem:

% I_y: er hundraðshlutfall minnkunar á afrakstri

b_C: er lokalífmassi að frádregnum upphafslífmassa í samanburðarhópnum

b_T: er lokalífmassi að frádregnum upphafslífmassa í meðferðarhópnum

Ferlar styrkháðrar svörunar teiknaðir

87. Teikna skal ferla styrkháðrar svörunar, sem sýna meðalvaxtarhindrun svarbreytunnar (I_r, eða I_y), reiknuð eins og sýnt er hér að framan, og lograðan styrk prófunaríðefnisins.

Mat á EC_x

88. Mat á EC_x (t.d. EC_{50}) skal byggt bæði á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x) og afrakstri (E_yC_x), hvort um sig skal byggjast á heildarvotþyngd sprota, heildarþurrþyngd sprota og heildarlengd sprota.

89. Tekið skal mið af því að gildin fyrir EC_x, sem reiknuð eru út með þessum tveimur svarbreytum, eru ekki samanburðarhæf og sá munur er hafður í huga þegar niðurstöður prófunarinnar eru notaðar. Vegna stærðfræðilegs grundvallar viðkomandi nálgana verða EC_x-gildi, sem byggjast á meðaltali sértæks vaxtarhraða (E_rC_x), í flestum tilvikum hærri en niðurstöður sem byggðar eru á afrakstri (E_yC_x), ef prófunarskilyrðum þessarar prófunaraðferðar er fylgt. Þessi munur skal ekki túlkaður sem munur á næmi svarbreytnanna tveggja, heldur einfaldlega þannig að gildin séu stærðfræðilega frábrugðin hvort öðru.

Tölfræðiaðferðir

90. Markmiðið er að fá fram megindlegt samband styrks og svörunar með aðhvarfsgreiningu. Hægt er að nota vegið línulegt aðhvarf þegar færsla svörunargagnanna hefur verið línugerð – t.d. probit- eða logit- eða Weibull-einingar (13. heimild), en ólínulegar aðhvarfsgreiningar eru æskilegri aðferðir sem ráða betur við óhjákvæmilegar misfellur í gögnum og frávik frá jafnri dreifingu. Nærri núlli, eða algerri vaxtarhindrun, geta slíkar misfellur magnast við umbreytinguna og truflað greininguna (13. heimild). Tekið skal mið af því að staðalaðferðir við greiningu sem nota probit-, logit- eða Weibull-umbreytingar eru ætlaðar til notkunar á skammtabundnum gögnum (t.d. dánartíðni eða lifun) og þeim skal breyta til að þær nái yfir gögn um vaxtarhraða eða afrakstur. Sértækar aðferðir við ákvörðun á EC_x-gildum með samfelldum gögnum má finna í 14.–17. heimild.

91. Nota skal feril styrks á móti svörun til útreikninga á punktmati EC_x-gilda fyrir allar svarbreytur sem þarf að greina. Fyrir hvert mat eru ákvörðuð 95% öryggismörk og meta skal mátgæði gagna við aðhvarfslíkanið, annaðhvort myndrænt eða tölfræðilega. Gera skal aðhvarfsgreiningar með svörun hverrar samhliða prófunar fyrir sig, ekki með meðaltali meðferðarhópa.

92. Einnig má fá mat á EC_{50}-gildum og öryggismörk með því að nota línulegan innreikning og nálgun með handahófsúrtökum (18. heimild) ef fyrirliggjandi aðhvarfslíkön/-aðferðir henta ekki fyrir gögnin.

93. Nauðsynlegt er að bera saman meðaltal meðferðarprófana með dreifnigreiningu til að fá mat á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif, og þar með styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Meðaltalið fyrir hvern styrkleika er svo borið saman við meðaltal samanburðarins með viðeigandi prófunaraðferð (t.d. Dunnett-próf, Williams-próf) (19.–22. heimild). Nauðsynlegt er að meta hvort forsenda dreifnigreiningar um normaldreifingu og einsleitni dreifninnar stenst. Þetta mat skal framkvæmt með Shapiro-Wilks-prófi (normaldreifing) eða Levene-prófi (einsleitni dreifninnar). Ef forsendan um normaldreifingu og einsleitni dreifni stenst ekki er stundum hægt að leiðrétta slíkt með lograðri umbreytingu gagnanna. Ef misleitni dreifninnar og/eða frávik frá normaldreifingu eru mjög mikil og ekki hægt að leiðrétta þau með umbreytingu má taka til athugunar að gera greiningu með aðferðum eins og Bonferroni-Welch-t-prófi, Jonkheere-Terpstra-leitniprófun með stiglækkun og Bonferroni-Median-prófi. Viðbótarleiðbeiningar um ákvörðun styrks, sem hefur engin merkjanleg áhrif, má finna í 16. heimild.

SKÝRSLUGJÖF

94. Prófunarskýrslan inniheldur eftirfarandi upplýsingar:

Prófunaríðefni

Efni með einum efnisþætti:

— útlit, vatnsleysni og aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreining, s.s. IUPAC- eða CAS-heiti, CAS-nr., SMILES- eða InChI-kóði, byggingarformúla, hreinleiki, efnakenni óhreininda, eins og við á og er tæknilega mögulegt, o.s.frv.

Fjölþáttaefni, UVCB-efni og blöndur:

— lýsing á eiginleikum eins og kostur er með efnakenni (sjá hér á undan), magnbundnu innihaldi og þeim eðlisefnafræðilegu eiginleikum efnisþáttanna sem skipta máli.

Prófunartegund

— vísindaheiti og uppruni.

Prófunarskilyrði

— tímalengd og aðstæður í bólfestufasa,

— prófunaraðferð sem er notuð (t.d. kyrrstöðu, hálfkyrrstöðu, púlsuð),

— upphafsdagur prófunarinnar og hve lengi hún stendur,

— prófunarmiðill, þ.e. set og fljótandi næringarefnamiðill,

— lýsing á tilhögun tilraunar: ræktunarklefi/-herbergi eða rannsóknarstofa, prófunarker og lok, rúmmál lausna, lengd og þyngd prófunarplantna í hverju prófunarkeri við upphaf prófunar, hlutfallið milli yfirborðs sets og vatnsyfirborðs, rúmmálshlutfall sets og vatns,

— prófunarstyrkur (nafnstyrkur og mældur styrkur, eftir því sem við á) og fjöldi samhliða prófana fyrir hvern styrk,

— aðferðir við tilreiðslu stofnlausna og prófunarlausna, þ.m.t. öll notkun leysa eða dreifiefna,

— hitastig meðan á prófun stendur,

— ljósgjafi, styrkur ágeislunar ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$),

— sýrustig prófunar- og samanburðarmiðla sem og útlit prófunarmiðla við upphaf prófunar og lok hennar,

— styrkur súrefnis,

— greiningaraðferð með viðkomandi gæðamatsgögnum (fullgildingarrannsóknir, staðalfrávik eða öryggismörk greininga),

— aðferðir til að ákvarða mælibreytur, t.d. lengd, þurrvigt, votvigt,

— öll frávik frá þessari prófunaraðferð.

Niðurstöður

— óunnin gögn: lengd sprota og þyngd sprota á hverri plöntu/í hverjum potti og aðrar mælibreytur í hverju prófunar- og samanburðarkeri við hverja athugun og greiningu samkvæmt matsáætluninni sem er að finna í töflu 1,

— meðaltal og staðalfrávik fyrir hverja mælibreytu,

— vaxtarferlar fyrir hvern styrk,

— tvöföldunartími/vaxtarhraði í samanburði, byggt á lengd sprota og votvigt, þ.m.t. frávíksstuðull fyrir afrakstur votvigtar,

— útreikningar á svarbreytum fyrir hverja samhliða meðferðarprófun, með meðalgildum og frávíksstuðli fyrir samhliða prófanir,

— myndræn útfærsla á sambandi styrks og áhrifa,

— mat á endapunktum eiturhrifa fyrir svarbreytur, t.d. EC_{50}, og viðkomandi öryggisbil. Minnsti styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif og/eða styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif, ef þeir hafa verið reiknaðir út, og tölfræðiaðferðirnar sem notaðar voru til að ákvarða þá,

— ef notuð var dreifnigreining: umfang áhrifanna sem greindust (t.d. minnsti marktækur munur),

— öll vaxtarörvun sem fram kom í öllum meðferðarprófunum,

— öll sýnileg merki um eitrun fyrir plöntur, sem og mælingar á prófunarlausnum,

— umfjöllun um niðurstöðurnar, þ.m.t. öll áhrif sem frávik frá prófunaraðferðinni hafa á niðurstöðu prófunarinnar.

HEIMILDIR:

(1) Kafli C.26 í þessum viðauka: Vaxtarhindrunarprófun á Lemna sp.

(2) Kafli C.3 í þessum viðauka: Vaxtarhindrunarprófun á ferskvatnsþörungum og blábakteríum.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Kafli C.50 í þessum viðauka: Eiturhrifaprófun á *Myriophyllum spicatum* án sets.

(8) Kafli C.28 í þessum viðauka: Prófun á eiturhrifum á mýflugulirfum í seti og vatni með notkun á íbættu vatni.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 - 237.

(11) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.’

1. viðbætir

SAMSETNING SMART- OG BARKO-MIÐILS

Efnisþáttur	Magn prófefnis sem bætt er í vatn (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (loftjafnvægi)	7,9

(*) Steinefnasneytt (þ.e. eimað eða afjónað) vatn.

2. viðbætir

SKILGREININGAR

Lífmassi er vot- og/eða þurrvigt lifandi efnis sem er í stofni. Í þessari prófun er lífmassi summa aðalsprotans, allra hliðargreina og allra róta.

Íðefni er efni eða blanda.

Gulnun er breyting á lit prófunarlífveru úr grænum yfir í gulleitan, einkum lit sveipanna.

EC_x er sá styrkur prófunaríðefnisins, sem er uppleyst í prófunarmiðlinum, sem veldur x% (t.d. 50%) samdrætti í vexti hjá *Myriophyllum spicatum* á tilgreindu váhrifatímabili (frávik frá fullum eða eðlilegum prófunartíma skulu tekin fram með skýrum hætti). Til ótvíræðrar merkingar á EC-gildum, sem leidd eru af vaxtarhraða eða afrakstri, er táknið „E_rC“ notað fyrir vaxtarhraða og E_yC fyrir afrakstur, að viðbættri mælibreytunni sem notuð er, t.d. E_rC (lengd aðalsprotans).

Vöxtur er aukning á mælibreytunni, t.d. lengd aðalsprotans, heildarlengd hliðargreina, heildarlengd sprota, heildarlengd róta, votvigt, þurrvigt eða fjöldi sveipa, á prófunartímabilinu.

Vaxtarhraði (meðaltal sértæks vaxtarhraða) er logruð aukning mælibreytunnar meðan á váhrifatímabilinu stendur. *Athugasemd:* Svarbreytur sem tengjast vaxtarhraða eru óháðar lengd prófunarinnar svo fremi sem vaxtarmynstur samanburðarlífvera, sem verða ekki fyrir váhrifum, er veldismynstur.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) er minnsti styrkur þar sem íðefnið reynist, innan tilgreinds váhrifatímabils, draga úr vexti á tölfræðilega marktækan hátt (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhóp. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif skal þó að valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Ef ekki er hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Mælibreytur eru hverjar þær breytur sem eru mældar, með hjálp einnar svarbreytu eða fleiri, til að lýsa endapunkti prófunarinnar. Í þessari prófunaraðferð eru lengd aðalsprotans, heildarlengd hliðargreina, heildarlengd sprota, heildarlengd róta, votvigt, þurrvigt og fjöldi sveipa mælibreytur.

Einrækt er rækt með einni tegund plantna.

Drep er dauður (þ.e. hvítur eða dökkbrúnn) vefur prófunarlífverunnar.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif.

Svarbreyta er breyta sem er notuð til að meta eiturhrif og er leidd út af öllum mældum breytum sem lýsa lífmassa með mismunandi reikniaðferðum. Að því er varðar þessa prófunaraðferð eru vaxtarhraði og afrakstur svarbreytur sem eru leiddar út frá mælibreytum s.s. lengd aðalsprotans, heildarlengd sprota, votvigt, þurrvigt eða fjölda sveipa.

Hálfkyrrstöðuprófun (endurnýjun) er prófun þar sem prófunarlausnin er endurnýjuð með ákveðnu millibili meðan á prófuninni stendur.

Kyrrstöðuprófun er prófunaraðferð þar sem prófunarlausn er ekki endurnýjuð meðan á prófuninni stendur.

Prófunaríðefni er sérhvert efni eða blanda sem er prófuð með þessari prófunaraðferð.

Endapunktur prófunarinnar lýsir almennum þætti sem prófunaríðefnið breytir miðað við samanburðarprófanir og sem er tilgangur prófunarinnar. Í þessari prófunaraðferð er endapunktur prófunarinnar vaxtarhindrun sem hægt er að gefa upp með mismunandi svarbreytum sem eru byggðar á einni mælibreytu eða fleiri.

Prófunarmiðill er tilbúni ræktunarmiðillinn í heild sinni sem prófunarplönturnar vaxa í meðan váhrifin frá prófunaríðefninu standa yfir. Yfirleitt er prófunaríðefnið uppleyst í prófunarmiðlinum.

UVCB-efni er efni af óþekktri eða breytilegri samsetningu, flókið myndefni eða líffræðilegt efni.

Afrakstur er gildi mælibreytu sem lýsir lífmassanum við lok váhrifatímabilsins að frádregnu gildi mælibreytunnar við upphaf váhrifatímabilsins. *Athugasemd:* Ef vaxtarmynstur lífvera, sem hafa ekki orðið fyrir váhrifum, er veldismynstur minnka svarbreytur sem byggjast á afrakstri eftir því sem líður á prófunina.

FRAMKVÆMDARÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/1412 **2017/EES/74/16**

frá 1. ágúst 2017

um viðurkenningu á Fiji samkvæmt tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/106/EB að því er varðar kerfi fyrir þjálfun og útgáfu skírteina farmanna

(tilkynnt með númeri C(2017) 5277) (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2008/106/EB frá 19. nóvember 2008 um lágmarksþjálfun sjómanna ([1]), einkum 3. mgr. 19. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Samkvæmt tilskipun 2008/106/EB geta aðildarríkin ákveðið að viðurkenna, með áritun, viðeigandi atvinnuskírteini og sérstök hæfnisskírteini farmanna, sem þriðju lönd gefa út, að því tilskildu að framkvæmdastjórnin viðurkenni viðkomandi þriðja land. Þriðju löndin verða að uppfylla allar kröfur samþykktar Alþjóðasiglingamálastofnunarinnar frá 1978 um menntun og þjálfun, skírteini og vaktstöður sjómanna (STCW-samþykktin).

2) Þýskaland fór fram á það, 18. febrúar 2011, að Fiji yrði viðurkennt. Framkvæmdastjórnin hefur, í kjölfar beiðninnar, haft samband við yfirvöld á Fiji í því skyni að meta kerfi þeirra um þjálfun og útgáfu skírteina til þess að ganga úr skugga um hvort landið fari að öllum kröfum STCW-samþykktarinnar og hvort viðeigandi ráðstafanir hafi verið gerðar til að koma í veg fyrir svik í tengslum við skírteini. Útskýrt var að matið myndi byggjast á niðurstöðum skoðunar til gagnaöflunar sem sérfræðingar á vegum Siglingaöryggisstofnunar Evrópu („Siglingaöryggisstofnunin“) eiga að annast á Fiji.

3) Framkvæmdastjórnin hefur lagt mat á kerfi Fiji um þjálfun og útgáfu skírteina á grundvelli niðurstaðna úr skoðun, sem fór fram í júní 2013, og að teknu tilliti til valfrjálsrar áætlunar um aðgerðir til úrbóta, sem yfirvöld á Fiji lögðu fram í september 2014 og sem bætt var við í desember 2014.

4) Við matið tilgreindi framkvæmdastjórnin nokkur atriði sem yfirvöld á Fiji þurfa að taka tillit til með tilhlýðilegum hætti, þ.m.t. ágallar að því er varðar innlend ákvæði, s.s. skortur á ákvæðum að því er varðar menntun og hæfi leiðbeinenda í tilteknum flokkum og ónógar eða ófullnægjandi kröfur um útgáfu skírteina, og einnig að því er varðar verklagsreglur um gæðastjórnun.

5) Í apríl 2015 sendi framkvæmdastjórnin yfirvöldum á Fiji matsskýrslu sem byggðist á niðurstöðum úr skoðuninni sem fram fór í júní 2013 og þar sem tekið var tillit til áætlunarinnar um aðgerðir til úrbóta, með viðbótum.

6) Yfirvöld á Fiji lögðu fram uppfærða áætlun um aðgerðir til úrbóta í júní 2015.

7) Á grundvelli allra fyrirliggjandi upplýsinga hefur framkvæmdastjórnin dregið þá ályktun að yfirvöld á Fiji hafi gripið til ráðstafana til að færa kerfi Fiji um þjálfun og útgáfu skírteina farmanna til samræmis við kröfur STCW-samþykktarinnar, að undanskildu einu fráviki í tengslum við kröfur varðandi útgáfu skírteina.

8) Fiji hefur samþykkt nýja löggjöf til að ráða bót á þeim ágöllum sem varða innlend ákvæði og hefur uppfært verklagsreglur um gæðakerfi í stjórnsýslu sinni og sjómannaskólum sínum fyrir farmenn sem og námsskrám og þjálfunaráætlun sjómannaskóla sinna fyrir farmenn.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 202, 3.8.2017, bls. 6. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 199/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XIII. viðauka (Flutningastarfsemi) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 323, 3.12.2008, bls. 33.

9) Deildir framkvæmdastjórnarinnar hafa óskað eftir útskýringu frá yfirvöldum á Fiji á frávikinu, sem framkvæmdastjórnin vakti máls á og um getur í 7. forsendu, varðandi kröfur um útgáfu skírteina. Umrætt frávik hefur ekki að neinu leyti áhrif á jákvætt heildarmat.

10) Lokaniðurstaða matsins sýnir að Fiji uppfyllir kröfur STCW-samþykktarinnar og á sama tíma hefur landið gert viðeigandi ráðstafanir til að koma í veg fyrir svik í tengslum við skírteini.

11) Aðildarríkin fengu skýrslu um niðurstöður matsins.

12) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari ákvörðun, eru í samræmi við álit nefndarinnar um öryggi á höfunum og varnir gegn mengun frá skipum.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Fiji hefur verið viðurkennt, skv. 19. gr. tilskipunar 2008/106/EB, að því er varðar kerfi fyrir þjálfun og útgáfu skírteina farmanna.

2. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 1. ágúst 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Violeta BULC

framkvæmdastjóri.

FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2017/815 **2017/EES/74/17**

frá 12. maí 2017

um breytingu á framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 að því er varðar nánari útlistun, samræmingu og einföldun á tilteknum flugverndarráðstöfunum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDSINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 300/2008 frá 11. mars 2008 um sameiginlegar reglur um flugvernd í almenningsflugi og um niðurfellingu reglugerðar (EB) nr. 2320/2002 ([1]), einkum 3. mgr. 4. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Reynslan af framkvæmd framkvæmdarreglugerðar framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1998 ([2]) hefur sýnt að gera þarf minniháttar breytingar á fyrirkomulagi á framkvæmd tiltekinna sameiginlegra grunnkrafna. Breytingarnar, sem lagðar eru til í meðfylgjandi textum, hafa ekki í för með sér neinar mikilvægar nýjar kröfur en greiða fyrir framkvæmd í reynd á flugverndarráðstöfunum ESB og byggjast á innleggi frá aðildarríkjum og hagsmunaaðilum á sviði flugverndar.

2) Í því skyni að auka skýrleika laga, staðla sameiginlega túlkun á löggjöfinni og til að tryggja enn frekar bestu framkvæmd sameiginlegra grunnkrafna um flugvernd ætti að útlista, samræma eða einfalda tilteknar sértækar flugverndarráðstafanir.

3) Breytingarnar varða framkvæmd takmarkaðs fjölda ráðstafana í tengslum við vernd á flugvöllum, vernd loftfara, skimun vökva, úðaefna og gels, lestarfarangur, farm og póst, birgðir til notkunar um borð, ráðningu og þjálfun starfsfólks og verndarbúnað.

4) Eftir gildistöku þessarar reglugerðar ætti að banna viðurkenndum umboðsaðilum að tilnefna fleiri skráða sendendur, eins og mælst er fyrir um í ríkisbréfi Alþjóðaflugmálastofnunarinnar (ICAO) 16/85. Áður en þeir missa stöðu sína, sem gerist í síðasta lagi 30. júní 2021, ættu skráðir sendendur, sem eru tilnefndir fyrir gildistöku þessarar reglugerðar, að hafa kost á að verða viðurkenndir umboðsaðilar eða þekktir sendendur.

5) Því ætti að breyta framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 til samræmis við það.

6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar um flugvernd í almenningsflugi.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 122, 13.5.2017, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 200/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XIII. viðauka (Flutningastarfsemi) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 97, 9.4.2008, bls. 72.

([2]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2015/1998 frá 5. nóvember 2015 um ítarlegar ráðstafanir til að framfylgja sameiginlegum grunnkröfum um flugvernd (Stjtíð. ESB L 299, 14.11.2015, bls. 1).

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 er breytt í samræmi við viðaukann við þessa reglugerð.

2. gr.

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

Hún gildir frá og með 1. júní 2017.

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

Gjört í Brussel 12. maí 2017.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

VIÐAUKI

Viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 er breytt sem hér segir:

1) í stað liðar 1.0.3 komi eftirfarandi:

„1.0.3 Hlutaðeigandi yfirvaldi er heimilt að leyfa sérstakt verklag um flugvernd eða veita undanþágur frá vörn og vernd á flugsvæðum flugvalla á þeim dögum þegar aðeins fer fram lestun, losun, borðganga eða landganga í einu loftfari í einu, annaðhvort á viðkvæmasta hluta haftasvæðis flugverndar eða á flugvelli sem fellur utan gildissviðs liðar 1.1.3, sbr. þó viðmiðanir um frávik sem settar eru fram í K-hluta viðaukans við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 272/2009 (*).

(*) Reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 272/2009 frá 2. apríl 2009 um viðbætur við sameiginlegar grunnkröfur um flugvernd í almenningsflugi sem mælt er fyrir um í viðauka við reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 300/2008 (Stjtíð. ESB L 91, 3.4.2009, bls. 7).“,

2) í stað liðar 1.1.3.1 komi eftirfarandi:

„1.1.3.1 Koma skal á fót viðkvæmustu hlutum haftasvæðis á flugvöllum þar sem fleiri en 60 einstaklingar hafa flugvallarskilríki sem veitir þeim aðgang að haftasvæðum flugverndar.“,

3) annar málsliður liðar 1.2.6.2 falli brott,

4) í stað liðar 1.2.6.3 komi eftirfarandi:

„1.2.6.3 Rafrænt leyfisbréf fyrir ökutæki skal annaðhvort:

a) fest á ökutækið þannig að ekki sé unnt að færa það eða

b) tengt við skráðan notanda ökutækisins í gegnum öruggan ökutækjaskráningargagnagrunn.

Á rafrænum leyfisbréfum fyrir ökutæki þurfa hvorki að koma fram þau svæði sem ökutækið hefur aðgangsheimild að né heldur síðasti gildisdagur, að því tilskildu að hægt sé að lesa upplýsingarnar rafrænt og að þær séu athugaðar áður en aðgangur að haftasvæðum flugverndar er leyfður. Einnig skal vera hægt að lesa rafræn leyfisbréf fyrir ökutæki rafrænt á haftasvæðum flugverndar.“,

5) í stað liðar 1.3.1.8 komi eftirfarandi:

„1.3.1.8 Dýr, sem eru notuð í rekstrarþágu og eru í umsjón einstaklings sem er handhafi gildandi flugvallarskilríkis, skulu skoðuð sjónrænt áður en aðgangur er veittur að haftasvæði flugverndar.“,

6) eftirfarandi liður 1.3.1.9 bætist við:

„1.3.1.9 Skimun annarra einstaklinga en farþega og hluta, sem þeir bera á sér, fellur einnig undir viðbótarákvæðin sem mælt er fyrir um í framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar C(2015) 8005.“,

7) í stað liðar 1.6.4 komi eftirfarandi:

„1.6.4 Staðfesting á tengslum milli einstaklings og hlutar eða hluta, sem hann ber með sér, skal liggja fyrir áður en einstaklingi er leyft að hafa meðferðis viðkomandi hlut eða hluti inn á haftasvæði flugverndar og að kröfu einstaklinga sem sinna eftirliti eða eftirlitsferðum samkvæmt c-lið liðar 1.5.1.“,

8) í stað liðar 3.0.6 komi eftirfarandi:

„3.0.6 Skráin yfir bannaða hluti að því er varðar flugverndarleit í loftfarinu að innanverðu er sú sama og sett er fram í fylgiskjali 1-A. Litið skal á samsettan sprengi- og íkveikjubúnað sem bannaðan hlut í tengslum við flugverndarleit í loftförum að utanverðu.“,

9) eftirfarandi liðir 3.0.7 og 3.0.8 bætist við:

„3.0.7 Að því er varðar þennan kafla merkir hugtakið „þjónustulúgur og -hlerar“ aðgangsop á loftfari utanverðu og þjónustuhólf með ytri handföngum eða sem lokast að utan með smellulás og eru notuð reglubundið til að veita flugafgreiðslu.

3.0.8. Tilvísanir í þriðju lönd í þessum kafla og í framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar C(2015) 8005 taka til annarra landa og yfirráðasvæða sem VI. bálkur í þriðja hluta sáttmálans um starfshætti Evrópusambandsins gildir ekki um, í samræmi við 355. gr. sáttmálans.“,

10) í stað liðar 4.1.3.1 komi eftirfarandi:

„4.1.3.1 Veita má vökva, úðaefni og geli, sem farþegar hafa meðferðis, undanþágu frá skimun með búnaði til greiningar sprengiefnis í fljótandi formi við komu inn á haftasvæði flugverndar í eftirfarandi tilvikum:

a) ef vökvinn, úðaefnið og gelið er í aðskildum ílátum sem rúma að hámarki 100 ml, eða sambærilegt í gagnsæjum, endurlokanlegum plastpoka sem rúmar að hámarki einn lítra þannig að nægilegt rými sé fyrir innihald plastpokans og pokanum sé að fullu lokað,

b) ef vökvanum, úðaefninu og gelinu er komið fyrir í sérstökum (e. *dedicated*) poka með innsigli, sem sýnir hvort lokun hans hafi verið rofin, þegar þau eru keypt á flugsvæði viðkomandi flugvallar.“,

11) í stað liðar 4.1.3.2 komi eftirfarandi:

„4.1.3.2 Sérstakir pokar með innsigli, sem sýna hvort lokun þeirra hafi verið rofin, sem um getur í b-lið í lið 4.1.3.1, skulu:

a) vera auðgreinanlegir sem pokar með innsigli, sem sýnir hvort lokun þeirra hafi verið rofin, sem notaðir eru á viðkomandi flugvelli og

b) innihalda sönnun um að vökvinn, úðaefnið eða gelið hafi verið keypt á viðkomandi flugvelli innan síðastliðinna þriggja klukkustunda og

c) falla undir viðbótarákvæðin sem mælt er fyrir um í framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar C(2015) 8005.“,

12) í stað liðar 4.1.3.3 komi eftirfarandi:

„4.1.3.3 Hlutaðeigandi yfirvöldum er heimilt að skipta vökvum, úðaefnum og geli í flokka sem, af hlutlægum ástæðum, skulu sæta sérstakri skimun eða mega vera undanþegnir henni. Framkvæmdastjórninni skal tilkynnt um flokkana.“,

13) eftirfarandi liður 4.1.3.4 bætist við:

„4.1.3.4 Skimun vökva, úðaefna og gels fellur einnig undir viðbótarákvæðin sem mælt er fyrir um í framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar C(2015) 8005.“,

14) í stað liðar 5.4.3 komi eftirfarandi:

„5.4.3 Flugrekandinn skal sjá til þess að farþegarnir séu upplýstir um bönnuðu hlutina, sem skráðir eru í fylgiskjali 5-B, á einhverjum tímapunkti áður en innritun er lokið.“,

15) annar málsliður liðar 6.2.1.5 falli brott,

16) í stað liðar 6.3.2.2 komi eftirfarandi:

„6.3.2.2 Viðurkenndur umboðsaðili eða flugrekandi skal biðja þann sem afhendir sendingar um að framvísa skilríki, vegabréfi, ökuskírteini eða öðru skjali með ljósmynd af viðkomandi einstaklingi, sem landsyfirvald hefur gefið út eða viðurkennt. Skilríkið eða skjalið skal notað til að staðfesta deili á þeim sem afhendir sendingarnar.“,

17) í stað liðar 6.3.2.4 komi eftirfarandi:

„6.3.2.4 Þegar flugverndarráðstafanirnar, sem um getur í liðum 6.3.2.1–6.3.2.3 í þessum viðauka og lið 6.3 í viðaukanum við framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar C(2015) 8005, hafa verið framkvæmdar skal viðurkenndur umboðsaðili tryggja vörn farms og pósts í samræmi við lið 6.6.“,

18) í stað e-liðar í lið 6.3.2.6 komi eftirfarandi:

„e) ástæða þess að staða flugverndar var gefin út, þar sem:

i. „KC“ þýðir að sendingin er móttekin frá þekktum sendanda eða

ii. „AC“ þýðir að sendingin er móttekin frá skráðum sendanda eða

iii. „RA“ þýðir að viðurkenndur umboðsaðili valdi sendinguna eða

iv. gefið er upp hvaða úrræði eða aðferð er notuð við skimun, þ.e.:

— handleit (PHS),

— röntgenbúnaður (XRY),

— búnaður til greiningar sprengiefnis (EDS),

— sprengjuleitarhundar (EDD),

— snefilgreiningartæki fyrir sprengiefni (ETD),

— sjónræn skoðun (VCK),

— málmleitartæki (CMD),

— einhver önnur aðferð (AOM) í samræmi við lið 6.2.1.6 þar sem tilgreina skal aðferðina sem er notuð eða

v. gefin er upp ástæða þess að sendingunni er veitt undanþága frá skimun,“

19) í stað a- og b-liðar í lið 6.4.1.2. komi eftirfarandi:

„a) umsækjandi skal sækja um samþykki hjá hlutaðeigandi yfirvaldi þess aðildarríkis þar sem starfsstöðin er staðsett.

Umsækjandinn skal leggja flugverndaráætlun fyrir hlutaðeigandi yfirvald. Í þeirri áætlun skal lýsa þeim aðferðum og því verklagi sem sendandinn á að fylgja til að fara að kröfum reglugerðar (EB) nr. 300/2008 og framkvæmdargerða hennar. Í áætluninni skal einnig lýst hvernig sendandinn skuli hafa eftirlit með því að þessum aðferðum og verklagi sé fylgt;

umsækjandinn skal fá afhentar „leiðbeiningar fyrir þekkta sendendur“, sem er að finna í fylgiskjali 6-B og „gátlistann um fullgildingu fyrir þekkta sendendur“ í fylgiskjali 6-C,

b) hlutaðeigandi yfirvald, eða ESB-matsmaður flugverndar fyrir hönd þess, skal rannsaka flugverndaráætlunina og síðan framkvæma sannprófun á tilgreindum starfsstöðvum til að meta hvort umsækjandinn fari að kröfum reglugerðar (EB) nr. 300/2008 og framkvæmdargerða hennar.

Til að meta hvort umsækjandinn fari að þessum kröfum skal hlutaðeigandi yfirvald eða ESB-matsmaður flugverndar, fyrir hönd þess, nota „gátlistann um fullgildingu fyrir þekkta sendendur“ sem er að finna í fylgiskjali 6-C. Á þessum gátlista er að finna yfirlýsingu um skuldbindingar, sem lagalegur fyrirsvarsmaður umsækjanda eða sá sem ber ábyrgð á verndinni á starfsstöðinni, á að skrifa undir.

Þegar lokið hefur verið við að semja gátlistann um fullgildingu skulu upplýsingarnar á gátlistanum flokkaðar sem trúnaðarmál;

undirritaða yfirlýsingin skal annaðhvort geymd hjá hlutaðeigandi yfirvaldi eða hjá ESB-matsmanni flugverndar og skal hún vera aðgengileg hlutaðeigandi yfirvaldi,“

20) annar málsliður liðar 6.4.1.6 falli brott,

21) í stað liða 6.5.1–6.5.4 komi eftirfarandi:

„6.5.1 Viðurkenndi umboðsaðilinn skal halda gagnagrunn sem inniheldur eftirfarandi upplýsingar um alla skráða sendendur sem hann hefur tilnefnt fyrir 1. júní 2017:

— upplýsingar um fyrirtækið, þ.m.t. áreiðanlegt heimilisfang fyrirtækisins og

— hvers eðlis fyrirtækið er og

— tengiliðaupplýsingar, þ.m.t. tengiliðaupplýsingar einstaklings eða einstaklinga sem bera ábyrgð á flugvernd og

— virðisaukaskattsnúmer eða skráningarnúmer fyrirtækisins og

— undirritaða „yfirlýsingu um skuldbindingar — skráður sendandi“ sem er að finna í fylgiskjali 6-D.

Þegar skráður sendandi er handhafi skírteinis fyrir viðurkenndan rekstraraðila, sem um getur í b- eða c-lið 1. liðar 14. gr. a í reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EBE) nr. 2454/93, skal númer skírteinisins fyrir viðurkennda rekstraraðilann geymt í gagnagrunninum sem um getur í fyrstu málsgrein.

Gagnagrunnurinn skal vera tiltækur til skoðunar fyrir hlutaðeigandi yfirvald.

6.5.2 Ef engin starfsemi er af hálfu skráða sendandans, að því er varðar flugfarm eða flugpóst á tveggja ára tímabili, fellur staða hans, sem skráður sendandi, úr gildi.

6.5.3 Ef viðeigandi yfirvald eða viðurkenndi umboðsaðilinn telur að skráður sendandi fari ekki lengur að þeim fyrirmælum sem er að finna í fylgiskjali 6-D skal viðurkenndi umboðsaðilinn tafarlaust svipta hinn skráða sendanda stöðu sinni. Staða hvers skráðs sendanda sem var tilnefndur af viðurkenndum umboðsaðila fellur niður 30. júní 2021.

6.5.4 Ef þær flugverndarráðstafanir sem tilteknar eru í „leiðbeiningum um flugvernd fyrir skráða sendendur“ hafa, af einhverjum ástæðum, ekki verið viðhafðar vegna sendingar, eða ef sendingin er ekki upprunnin hjá skráða sendandanum, á hans eigin ábyrgð, skal skráði sendandinn taka það skýrt fram við viðurkennda umboðsaðilann svo hægt sé að beita lið 6.3.2.3.“,

22) liðir 6.5.5 og 6.5.6 falli brott,

23) í stað fyrirsagnar í lið 6.6.2 komi eftirfarandi:

„Vörn farms og pósts við meðhöndlun, geymslu og þegar hann er settur um borð í loftfar“,

24) í stað liðar 6.6.2.2 komi eftirfarandi:

„6.6.2.2 Farm- og póstsendingar, sem eru á öðrum svæðum en viðkvæmasta hluta haftasvæðis flugverndar, skulu varðar gegn óheimilum aðgangi þar til þær hafa verið afhentar öðrum viðurkenndum umboðsaðila eða flugrekanda. Sendingarnar skulu staðsettar á aðgangsstýrðum hlutum athafnasvæðis viðurkennds umboðsaðila eða, þegar þær eru staðsettar utan slíkra svæða, skulu teljast varðar gegn óheimilum aðgangi ef:

a) þær eru varðar með áþreifanlegum hætti til að koma í veg fyrir að bönnuðum hlutum sé komið fyrir í þeim eða

b) þær eru ekki skildar eftir eftirlitslausar og aðgangur að þeim takmarkast við starfsfólk sem tekur þátt í að verja farm og póst og setja hann um borð í loftfarið.“,

25) í stað liða 6.8.2.3. og 6.8.2.4. komi eftirfarandi:

„6.8.2.3 Hlutaðeigandi yfirvöldum er heimilt að samþykkja ESB-fullgildingarskýrslu um flugvernd frá einingu í þriðja landi, eða frá öðrum ACC3-flugrekanda, með hliðsjón af ACC3-tilnefningu, þegar sú eining eða sá ACC3-flugrekandi annast alla meðhöndlun farms, þ.m.t. lestun loftfarsins, fyrir hönd flugrekandans, sem sækir um ACC3-fullgildingu, og ESB-fullgildingarskýrslan um flugvernd tekur til allrar starfseminnar.

6.8.2.4 Skrá skal ESB-fullgildingu flugverndar í fullgildingarskýrslu, sem samanstendur a.m.k. af yfirlýsingu um skuldbindingar, eins og hún er sett fram í fylgiskjali 6-H1, gátlista sem settur er fram í fylgiskjali 6-C3, og yfirlýsingu ESB-matsmanns flugverndar sem sett er fram í fylgiskjali 11-A. ESB-matsmaður flugverndar skal leggja fullgildingarskýrslu fyrir hlutaðeigandi yfirvald og afhenda flugrekandanum, sem hefur fengið fullgildingu, afrit af henni.“,

26) liður 6.8.2.5 falli brott,

27) í stað liðar 6.8.3.1 komi eftirfarandi:

„6.8.3.1 ACC3-flugrekandi skal tryggja að allur farmur og póstur, sem fluttur er, með hliðsjón af flugskiptum, gegnumferð eða affermingu, til flugvalla í Sambandinu, sé skimaður, nema:

a) viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar (RA3) hafi viðhaft tilskildar flugverndarráðstafanir vegna sendingarinnar og sendingin hafi verið varin gegn óheimilum aðgangi frá því þessar flugverndarráðstafanir voru gerðar og þar til hún var sett um borð eða

b) þekktur sendandi með ESB-fullgildingu flugverndar (KC3) hafi viðhaft tilskildar flugverndarráðstafanir vegna sendingarinnar og sendingin hafi verið varin gegn óheimilum aðgangi frá því þessar flugverndarráðstafanir voru gerðar og þar til hún var sett um borð eða

c) skráður sendandi (AC3), á ábyrgð ACC3-flugrekanda eða viðurkennds umboðsaðila með ESB-fullgildingu flugverndar (RA3), hafi viðhaft tilskildar flugverndarráðstafanir vegna sendingarinnar og sendingin hafi verið varin gegn óheimilum aðgangi frá því þessar flugverndarráðstafanir voru gerðar og þar til hún var sett um borð og hún sé ekki sett um borð í farþegaloftfar eða

d) sendingin sé undanþegin skimun í samræmi við d-lið liðar 6.1.1 og hafi verið varin gegn óheimilum aðgangi frá því að hún varð auðgreinanlegur flugfarmur eða flugpóstur og þar til hún var sett um borð.

Ákvæði c-liðar skulu gilda til 30. júní 2021.“,

28) í stað liða 6.8.3.4. og 6.8.3.5. komi eftirfarandi:

„6.8.3.4 Þegar ACC3-flugrekendur, RA3-umboðsaðilar eða KC3-sendendur bjóða út sendingar, þar sem þeir hafa gert tilskildar flugverndarráðstafanir, til annarra ACC3-flugrekenda eða KC3-sendenda skulu þeir gefa upp í meðfylgjandi gögnum einstakt alstafakennimerki sem fengið er frá hlutaðeigandi yfirvaldi sem veitti tilnefninguna.

6.8.3.5 Þegar ACC3-flugrekandi eða KC3-sendandi tekur á móti sendingu skal hann staðfesta að flugrekandinn eða einingin, sem sendi hana, sé annar ACC3-flugrekandi, RA3-umboðsaðili eða KC3-sendandi, með því að:

a) sannprófa að einstakt alstafakennimerki einingarinnar, sem afhendir sendinguna, sé tilgreint í meðfylgjandi gögnum og

b) staðfesta að sá flugrekandi eða sú eining sem afhendir sendinguna sé skráð „virk“ í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju fyrir tilgreinda flugvöllinn eða starfsstöðina, eins og við á.

Ef kennimerkið kemur ekki fram í meðfylgjandi gögnum eða ef sá flugrekandi eða sú eining sem afhendir sendingarnar er ekki skráð „virk“ í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju skal það metið svo að flugverndarráðstafanir hafi ekki verið framkvæmdar og sendingarnar skulu skimaðar af ACC3-flugrekandanum eða af öðrum RA3-umboðsaðila sem hefur fengið ESB-fullgildingu flugverndar, áður en þær eru settar um borð í loftfarið.“,

29) eftirfarandi liðir 6.8.3.6 og 6.8.3.7 bætist við:

„6.8.3.6 Þegar flugverndarráðstafanirnar, sem um getur í liðum 6.8.3.1–6.8.3.5, hafa verið framkvæmdar skal ACC3-flugrekandinn eða viðurkenndi umboðsaðilinn, sem hefur fengið ESB-fullgildingu flugverndar (RA3), sem starfar á hans vegum sjá til þess að í meðfylgjandi gögnum, annaðhvort flugfarmbréfi, sambærilegum póstskjölum eða sérstakri yfirlýsingu, og annaðhvort á rafrænu formi eða skriflega, komi a.m.k. eftirfarandi fram:

a) einstakt alstafakennimerki ACC3-flugrekandans og

b) staða flugverndar fyrir sendinguna, sem um getur í d-lið liðar 6.3.2.6 og viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar (RA3) gefur út, og

c) einstakt kennimerki sendingarinnar, t.d. númerið á grunnflugfarmbréfinu (e. *house air waybill*) eða aðalflugfarmbréfinu (e. *master air waybill*), þegar við á, og

d) innihald sendingarinnar og

e) ástæður þess að staða flugverndar var gefin út, þ.m.t. þau úrræði eða sú aðferð sem var notuð við skimun eða ástæða þess að sendingunni var veitt undanþága frá skimun, með því að nota staðla sem samþykktir voru í áætluninni um yfirlýsingu um flugvernd sendinga.

6.8.3.7 Ef viðurkennda umboðsaðilanum í þriðja landi, sem um getur í b-lið liðar 6.8.3.6, er ekki til að dreifa hefur ACC3-flugrekandi eða flugrekandi sem kemur frá þriðja landi, sem skráð er í fylgiskjali 6-Fi eða 6-Fii, heimild til að gefa út yfirlýsingu um stöðu flugverndar.“,

30) í stað liða 6.8.4 og 6.8.5 komi eftirfarandi:

„6.8.4. **Tilnefning viðurkenndra umboðsaðila og þekktra sendenda**

6.8.4.1. Tilnefna má einingar í þriðja landi sem eru, eða ætla sér að verða, hluti af aðfangakeðju flugrekanda með ACC3-stöðu, sem annaðhvort „viðurkennda umboðsaðila í þriðju löndum“ (RA3) eða „þekkta sendendur í þriðju löndum“ (KC3).

6.8.4.2. Til að fá tilnefningu skal einingin beina beiðninni til:

a) hlutaðeigandi yfirvalds aðildarríkis sem ber ábyrgð á ACC3-tilnefningu flugrekanda á þeim flugvelli í þriðja landi þar sem umsækjandinn meðhöndlar farm á leið til ESB eða

b) þegar enginn tilnefndur ACC3-flugrekandi er í því landi: hlutaðeigandi yfirvalds aðildarríkis sem ber ábyrgð á að viðurkenna ESB-matsmann flugverndar sem framkvæmir, eða hefur framkvæmt, vottunina.

Hlutaðeigandi yfirvald sem fær beiðnina skal hefja tilnefningarferlið eða gera samkomulag við hlutaðeigandi yfirvald í öðru aðildarríki um úthlutun hennar, með tilliti til samvinnu á sviði stjórnmála eða flugmála, eða beggja.

6.8.4.3. Áður en tilnefning er gerð skal staðfesta hæfi umsækjandans til að fá RA3- eða KC3-stöðu í samræmi við lið 6.8.4.1.

6.8.4.4. Tilnefning einingar sem RA3-umboðsaðila eða sem KC3-sendanda, að því er varðar farm- og póstflutninga hans („viðkomandi farmflutningar“), skal byggjast á eftirfarandi:

a) tilnefningu einstaklings sem ber heildarábyrgð fyrir hönd einingarinnar á framkvæmd verndarákvæða um farm eða póst að því er varðar viðkomandi farmflutninga og

b) ESB-fullgildingarskýrslu vegna flugverndar þar sem staðfest er innleiðing verndarráðstafana.

6.8.4.5. Hlutaðeigandi yfirvald skal úthluta tilnefnda RA3-umboðsaðilanum eða KC3-sendandanum einstöku alstafakennimerki á stöðluðu sniði í því skyni að auðkenna eininguna og það þriðja land þar sem einingin er tilnefnd til að koma verndarákvæðum um farm eða póst, sem senda á til Sambandsins, til framkvæmda.

6.8.4.6. Tilnefningin skal gilda frá þeim degi sem hlutaðeigandi yfirvald færði upplýsingar um eininguna í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju, í þrjú ár hið lengsta.

6.8.4.7. Eining, sem er skráð sem RA3-umboðsaðili eða KC3-sendandi í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju, skal viðurkennd í öllum aðildarríkjum að því er varðar starfsemi sem tengist farmi eða pósti sem ACC3-flugrekstraraðili flytur frá viðkomandi flugvelli í þriðja landi til Sambandsins.

6.8.4.8. Tilnefningar RA3-umboðsaðila og KC3-sendanda, sem eru veittar fyrir 1. júní 2017, skulu falla úr gildi fimm árum eftir tilnefningar þeirra eða 31. mars 2020, hvor dagsetningin sem kemur fyrr.

6.8.4.9. ESB-matsmenn flugverndar skulu, að fenginni beiðni frá hlutaðeigandi yfirvaldi sem viðurkenndi þá, gera aðgengilegar upplýsingarnar, sem er að finna í 1. hluta gátlistans sem settur er fram í fylgiskjali 6-C2 eða 6-C4, eftir því sem við á, fyrir hverja einingu sem þeir hafa tilnefnt, til að koma á fót samsteyptri skrá yfir einingar sem hafa verið tilnefndar af ESB-matsmönnum flugverndar.

6.8.5 **Fullgilding viðurkenndra umboðsaðila og þekktra sendenda**

6.8.5.1. Til að verða tilnefndur sem viðurkenndur umboðsaðili eða þekktur sendandi með ESB-fullgildingu flugverndar skulu einingar í þriðju löndum öðlast fullgildingu samkvæmt einum af eftirfarandi tveimur valkostum:

a) í flugverndaráætlun ACC3-flugrekanda skal setja fram upplýsingar um flugverndarráðstafanir sem einingar í þriðju löndum, sem hann tekur við farmi eða pósti frá, með hliðsjón af beinum flutningi til Sambandsins, hafa framkvæmt fyrir hans hönd, ESB-fullgilding flugverndar til handa ACC3-flugrekanda skal fullgilda flugverndarráðstafanir, sem þessar einingar beita, eða

b) einingar í þriðja landi skulu, eigi sjaldnar en á þriggja ára fresti, leggja inn beiðni um ESB-fullgildingu flugverndar að því er varðar viðkomandi starfsemi í tengslum við afgreiðslu farms. ESB-fullgilding flugverndar skal samanstanda af eftirfarandi:

i. athugun á flugverndaráætlun einingarinnar til að tryggja að hún sé viðeigandi og heildstæð, að því er varðar þann rekstur sem fram fer, og

ii. sannprófun á vettvangi á framkvæmd flugverndarráðstafana að því er varðar viðkomandi farmflutninga.

Að því er varðar viðurkennda umboðsaðila í þriðju löndum skal fullgildingarskýrslan samanstanda af yfirlýsingu um skuldbindingar, eins og sett er fram í fylgiskjali 6-H2, og gátlista, eins og sett er fram í fylgiskjali 6-C2, og hvað varðar þekkta sendendur í þriðju löndum skal hún samanstanda af yfirlýsingu um skuldbindingar, eins og sett er fram í fylgiskjali 6-H3 og gátlista sem settur er fram í fylgiskjali 6-C4. Fullgildingarskýrslan skal einnig innihalda yfirlýsingu frá ESB-matsmanni flugverndar, eins og sett er fram í fylgiskjali 11-A.

6.8.5.2. Þegar ESB-fullgildingu flugverndar, samkvæmt b-lið liðar 6.8.5.1, er lokið skal ESB-matsmaður flugverndar leggja fullgildingarskýrsluna fyrir hlutaðeigandi yfirvald og afhenda fullgiltu einingunni afrit af henni.

6.8.5.3. Samræmiseftirlit hlutaðeigandi yfirvalds í aðildarríki eða framkvæmdastjórnarinnar getur talist vera ESB-fullgilding flugverndar, að því tilskildu að hún nái til allra þeirra sviða sem tiltekin eru á gátlistanum í fylgiskjali 6-C2 eða 6-C4, eftir því sem við á.

6.8.5.4. ACC3-flugrekandi skal halda gagnagrunn þar sem finna má a.m.k. eftirfarandi upplýsingar um hvern viðurkenndan umboðsaðila eða þekktan sendanda, sem hlotið hefur ESB-fullgildingu flugverndar, í samræmi við lið 6.8.5.1, og sem ACC3-flugrekandinn tekur á móti farmi eða pósti frá, með beinum hætti, til flutnings inn í Sambandið:

a) upplýsingar um fyrirtækið, þ.m.t. áreiðanlegt heimilisfang fyrirtækisins, og

b) hvers eðlis fyrirtækið er, að undanskildum viðkvæmum viðskiptaupplýsingum,

c) tengiliðaupplýsingar, þ.m.t. tengiliðaupplýsingar einstaklings eða einstaklinga sem bera ábyrgð á flugvernd og

d) skráningarnúmer fyrirtækisins, ef við á, og

e) fullgildingarskýrsluna, þar sem hún liggur fyrir, og

f) hið einstaka alstafakennimerki sem úthlutað var í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju.

Gagnagrunnurinn skal, eftir atvikum, innihalda framangreindar upplýsingar um hvern skráðan sendanda sem er á ábyrgð ACC3-flugrekandans, í samræmi við c-lið liðar 6.8.3.1, og sem ACC3-flugrekandinn tekur á móti farmi eða pósti frá, með beinum hætti, til flutnings inn í Sambandið.

Gagnagrunnurinn skal vera aðgengilegur til að skoða ACC3-flugrekandann.

Aðrar einingar með ESB-fullgildingu flugverndar mega halda slíkan gagnagrunn.

6.8.5.5. Eining, sem flytur flugfarm eða -póst og sem starfrækir net sem samanstendur af mismunandi starfsstöðvum í þriðju löndum, getur fengið staka tilnefningu sem viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar, sem tekur til allra starfsstöðva netsins, að því tilskildu:

a) að viðeigandi flugverndaraðgerðir innan ramma netsins, þ.m.t. flutningaþjónusta á milli starfsstöðva, falli undir eina flugverndaráætlun eða staðlaðar flugverndaráætlanir og

b) að framkvæmd flugverndaráætlunar eða -áætlana falli undir stakt innra gæðakerfi á sviði flugverndar, sem jafngildir ESB-fullgildingu flugverndar, og

c) að áður en netið er tilnefnt sem viðurkenndur umboðsaðili fyrir ESB-flugvernd skulu eftirfarandi starfsstöðvar einingarinnar hafa gengist undir ESB-fullgildingu flugverndar:

i. starfsstöðin eða starfsstöðvarnar þaðan sem farmurinn eða pósturinn er sendur beint til ACC3-flugrekanda og

ii. a.m.k. tvær starfsstöðvar, þó að lágmarki 20% af öllum starfsstöðvum netsins, hvor talan sem er hærri, þaðan sem farmurinn eða pósturinn er færður til starfsstöðvarinnar eða starfsstöðvanna, sem um getur í i. lið, og

iii. allar starfsstöðvar í þriðju löndum sem eru taldar upp í fylgiskjali 6-I í framkvæmdarákvörðun framkvæmdastjórnarinnar C(2015) 8005.

Til þess að halda tilnefningu sem viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar fyrir allar starfsstöðvar netsins, sem fullgilda á eigi síðar en 30. júní 2018, skulu, á hverju ári eftir að tilnefningin fór fram, a.m.k. tvö svæði til viðbótar eða 20% starfsstöðvanna, hvort sem er hærra, þaðan sem farmur eða póstur er færður til starfsstöðvarinnar eða -stöðvanna, sem um getur í i. lið, gangast undir ESB-fullgildingu flugverndar þar til allar starfsstöðvarnar hafa fengið fullgildingu.

ESB-matsmaður flugverndar skal gera áætlun sem felur í sér skrá yfir handahófsvalda staði sem á að fullgilda ár hvert. Áætlunin skal gerð óháð einingunni sem starfrækir netið og má sú eining ekki breyta áætluninni. Þessi áætlun skal vera óaðskiljanlegur hluti af þeirri fullgildingarskýrslu sem liggur til grundvallar þess að netið er tilnefnt sem viðurkenndur umboðsaðili í þriðja landi með ESB-fullgildingu.

Þegar starfsstöð netsins hefur gengist undir ESB-fullgildingu flugverndar skal litið svo á að hún sé viðurkenndur umboðsaðili í þriðja landi í samræmi við lið 6.8.4.2.

6.8.5.6. Ef ESB-fullgilding flugverndar, að því er varðar starfsstöð nets, sem um getur í ii. lið c-liðar í lið 6.8.5.5, leiðir í ljós að starfsstöðin uppfylli ekki markmiðin í gátlistanum í fylgiskjali 6-C2, skal farmur og póstur frá hlutaðeigandi starfsstöð skimaður á starfsstöð, sem er tilnefnd sem viðurkenndur umboðsaðili í þriðja landi í samræmi við lið 6.8.4.2, þar til ESB-fullgilding flugverndar staðfestir að markmiðin á gátlistanum hafi verið uppfyllt.

6.8.5.7. Liðir 6.8.5.5 og 6.8.5.6 falla úr gildi 30. júní 2018.“,

31) eftirfarandi liður 6.8.6 bætist við:

„6.8.6 **Þegar ekki er farið að tilskildum ákvæðum og afturköllun ACC3-, RA3- og KC3-tilnefninga**

6.8.6.1. *Þegar ekki er farið að tilskildum ákvæðum*

1. Ef framkvæmdastjórnin eða hlutaðeigandi yfirvald kemst að raun um alvarlegt frávik sem varðar starfsemi ACC3-flugrekanda, RA3-umboðsaðila eða KC3-sendanda, sem talið er hafa veruleg áhrif á almenna flugvernd í Sambandinu, skal:

   a) þegar í stað upplýsa viðkomandi flugrekanda eða einingu um það, óska eftir athugasemdum frá henni og að hún geri viðeigandi ráðstafanir til að ráða bót á alvarlega frávikinu og

   b) tilkynna öðrum aðildarríkjum og framkvæmdastjórninni um það.

2. Ef ACC3-flugrekandinn, RA3-umboðsaðilinn eða KC3-sendandinn hefur ekki ráðið bót á alvarlega frávikinu innan tiltekinna tímamarka, eða ef ACC3-flugrekandinn, RA3-umboðsaðilinn eða KC3-sendandinn bregst ekki við kröfunni, sem fjallað er um í a-lið liðar 6.8.6.1, skal yfirvaldið eða framkvæmdastjórnin:

   a) gera ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu flugrekandans eða einingarinnar í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju óvirka eða

   b) óska þess að hlutaðeigandi yfirvald, sem ber ábyrgð á tilnefningunni, geri ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu flugrekandans eða einingarinnar í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju óvirka.

   Við þær aðstæður sem um getur í fyrstu málsgrein skal yfirvaldið eða framkvæmdastjórnin tafarlaust tilkynna hinum aðildarríkjunum og framkvæmdastjórninni um það.

3. Flugrekandi eða eining með ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu, sem var gerð óvirk í samræmi við lið 6.8.6.1.2, skal ekki endurheimta stöðu sína eða vera tekin inn í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju fyrr en endurtilnefning í tengslum við ESB-flugvernd hefur farið fram í samræmi við lið 6.8.1 eða 6.8.4.

4. Ef flugrekandi eða eining hefur ekki lengur ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu skulu hlutaðeigandi yfirvöld gera viðeigandi ráðstafanir til að fullvissa sig um að aðrir aðilar með ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu, sem þau bera ábyrgð á og sem starfa innan aðfangakeðju flugrekandans eða einingarinnar sem hefur misst þessa stöðu, fari enn að kröfunum í reglugerð (EB) nr. 300/2008.

6.8.6.2. *Afturköllun*

1. Hlutaðeigandi yfirvald, sem tilnefndi ACC3-flugrekandann, RA3-umboðsaðilann eða KC3-sendandann, ber ábyrgð á því að fella viðkomandi aðila brott úr „gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju“:

   a) að beiðni eða í samráði við flugrekandann eða einingunа eða

   b) ef ACC3-flugrekandi, RA3-umboðsaðili eða KC3-sendandi sinnir ekki viðkomandi vinnu við farm og bregst ekki við beiðni um athugasemdir eða kemur með öðrum hætti í veg fyrir mat á áhættu fyrir flug.

2. Ef flugrekandi eða eining hefur ekki lengur ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu skulu hlutaðeigandi yfirvöld gera viðeigandi ráðstafanir til að fullvissa sig um að aðrir aðilar með ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu, sem þau bera ábyrgð á og sem starfa innan aðfangakeðju flugrekandans eða einingarinnar sem hefur misst þessa stöðu, fari enn að kröfunum í reglugerð (EB) nr. 300/2008.“,

32) í stað fylgiskjala 6-C2, 6-C3 og 6-C4 komi eftirfarandi:

„FYLGISKJAL 6-C2

GÁTLISTI FYRIR FULLGILDINGU AÐ ÞVÍ ER VARÐAR VIÐURKENNDA UMBOÐSAÐILA Í ÞRIÐJA LANDI MEÐ ESB-FULLGILDINGU FLUGVERNDAR

Einingar í þriðja landi eiga kost á að verða hluti af verndaðri aðfangakeðju ACC3-flugrekanda (flugrekandi sem flytur farm eða póst með flugi til Sambandsins frá flugvelli í þriðja landi), með því að óska eftir því að vera tilnefndar sem viðurkenndur umboðsaðili í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar (RA3-umboðsaðili). RA3-umboðsaðili er eining í þriðja landi, sem sér um afgreiðslu farms, sem hefur fengið fullgildingu og verið samþykkt sem slík á grundvelli ESB-fullgildingar flugverndar.

RA3-umboðsaðili skal tryggja að viðeigandi flugverndarráðstafanir séu viðhafðar vegna sendinga til Evrópusambandsins, þ.m.t. skimun, ef við á, og að sendingarnar hafi verið varðar gegn óheimilum aðgangi frá því að flugverndarráðstafanirnar voru gerðar og þar til sendingarnar hafa verið settar um borð í loftfar eða afhentar á annan hátt ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila.

Í framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 er mælt fyrir um forsendur fyrir því að geta flutt farm eða póst með flugi til Sambandsins ([1]) eða Íslands, Noregs og Sviss.

Gátlistinn er stjórntæki sem ESB-matsmaður flugverndar á að nota til að meta verndarstig flugfarms eða flugpósts ([2]), sem einingin, sem sækir um tilnefningu sem RA3-umboðsaðili, flytur með flugi til ESB eða EES eða er ábyrg fyrir flutningnum. Gátlistann á aðeins að nota í tilvikunum sem eru tilgreind í b-lið liðar 6.8.5.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998. Í tilvikunum, sem tilgreind eru í a-lið liðar 6.8.5.1 í fyrrnefndum viðauka, skal ESB-matsmaður flugverndar nota ACC3-gátlistann.

Fullgildingarskýrsluna skal afhenda hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, og einingunni, sem hefur fengið fullgildingu, innan eins mánaðar hið lengsta eftir að sannprófun á starfsstöð hefur farið fram. Óaðskiljanlegir hlutar fullgildingarskýrslu skulu a.m.k. vera:

— fullgerður gátlisti, undirritaður af ESB-matsmanni flugverndar og, eftir atvikum, með athugasemdum frá einingunni sem hefur fengið fullgildingu og

— yfirlýsing um skuldbindingar (fylgiskjal 6-H2 við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998), undirrituð af einingunni sem hefur fengið fullgildingu og

— yfirlýsing um sjálfstæði (fylgiskjal 11-A við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998), að því er varðar eininguna, sem hefur fengið fullgildingu, sem ESB-matsmaður flugverndar hefur undirritað.

Númeraröð blaðsíðna, dagsetning ESB-fullgildingar flugverndar og merking hverrar blaðsíðu með upphafsstöfum matsmanns og einingarinnar, sem hefur fengið fullgildingu, skulu sýna fram á heildarsamfellu fullgildingarskýrslunnar.

RA3-umboðsaðilinn skal geta notað skýrsluna í viðskiptatengslum sínum við alla ACC3-flugrekendur og, eftir atvikum, alla RA3-umboðsaðila.

Fullgildingarskýrslan skal ávallt vera á ensku.

Meta skal 5. hluta — Skimun og 6. hluta — Farmur eða póstur sem mikil áhætta fylgir (HRCM), með hliðsjón af kröfunum í liðum 6.7 og 6.8 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998. Að því er varðar þá hluta sem ekki er hægt að meta samkvæmt kröfunum í framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998, fela grunnkröfur í sér kröfur og ráðlagðar starfsvenjur í 17. viðauka við Chicago-samninginn um alþjóðlegt almenningsflug og leiðbeiningar sem finna má í handbók Alþjóðaflugmálastofnunarinnar um flugvernd (skjal nr. 8973-takmörkuð dreifing).

Athugasemdir til útskýringar:

— Fylla verður út alla gildandi og viðeigandi hluta gátlistans í samræmi við viðskiptalíkan og starfsemi einingarinnar sem á að fullgilda. Ef engar upplýsingar eru fáanlegar verður að gera grein fyrir því.

([1]) Aðildarríki Evrópusambandsins: Austurríki, Belgía, Búlgaría, Króatía, Kýpur, Tékkland, Danmörk, Eistland, Finnland, Frakkland, Þýskaland, Grikkland, Ungverjaland, Írland, Ítalía, Lettland, Litháen, Lúxemborg, Malta, Holland, Pólland, Portúgal, Rúmenía, Slóvakía, Slóvenía, Spánn, Svíþjóð og Bretland.

([2]) Þegar þessi gátlisti um fullgildingu varðar flugfarm eða flugpóst eða loftfar þar sem ákvörðunarstaðurinn er ESB eða EES, varðar hann að sama skapi flugfarm eða flugpóst eða loftfar þar sem ákvörðunarstaðurinn er ESB sem og Ísland, Noregi og Sviss.

— Að loknum hverjum hluta skal ESB-matsmaður flugverndar komast að niðurstöðu um það hvort og að hve miklu leyti markmið þessa hluta hafi náðst.

1. HLUTI

Auðkenning einingarinnar, sem hefur fengið fullgildingu, og deili á matsmanni

1.1.	Dagsetning eða dagsetningar fullgildingar	
	Nota skal nákvæmt snið fyrir dagsetningar, s.s. frá 01.10.2012 til 02.10.2012	
	dd/mm/áááá	
1.2.	Dagsetning fyrri fullgildingar, ef við á	
	dd/mm/áááá	
	Fyrra RA3-skráningarnúmer, ef það liggur fyrir	
	Skírteini fyrir viðurkenndan rekstraraðila (AEO) eða C-TPAT-staða eða hugsanleg útgáfa annarra skírteina	
1.3.	Upplýsingar um matsmann flugverndar	
	Nafn	
	Fyrirtæki/stofnun/yfirvald	
	Einstakt alstafakennimerki (UAI)	
	Tölvupóstfang	
	Símanúmer — þ.m.t. alþjóðakóðar	
1.4.	Heiti einingar	
	Heiti	
	Númer fyrirtækis (t.d. kenninúmer í fyrirtækjaskrá, ef við á)	
	Númer/Deild/Bygging	
	Gata	
	Bæjarfélag	
	Póstnúmer	
	Ríki (ef við á)	

Land	
Heimilisfang pósthólfs, ef við á	

1.5. Aðalheimilisfang stofnunar (ef það er annað en starfsstöðvarinnar sem á að fullgilda)

Númer/Deild/Bygging	
Gata	
Bæjarfélag	
Póstnúmer	
Ríki (ef við á)	
Land	
Heimilisfang pósthólfs, ef við á	

1.6. Eðli viðskipta — Það getur verið um að ræða fleiri en eina tegund viðskipta

a) eingöngu flugfarmur b) flutningar í lofti og annar flutningsmáti c) farmmiðlari með athafnasvæði fyrir farm d) farmmiðlari sem hefur ekki athafnasvæði fyrir farm e) afgreiðsluaðili f) annað.	

1.7. Tekur umsækjandi...?

a) á móti farmi frá öðrum viðurkenndum umboðsaðila í þriðja landi?	
b) á móti farmi frá þekktum sendendum í þriðja landi?	
c) á móti farmi frá skráðum sendendum í þriðja landi?	
d) á móti farmi sem fellur undir undanþágu?	
e) á móti farmi sem hann skimar?	
f) á móti farmi sem hann setur í geymslu?	
g) á móti öðru (tilgreina skal hvað).	

1.8. Áætlaður fjöldi starfsmanna á starfsstöð

Fjöldi	

1.9. Nafn og titill einstaklings sem ber ábyrgð á vernd flugfarms eða flugpósts frá þriðja landi

Nafn	
Starfsheiti	
Tölvupóstfang	
Símanúmer — þ.m.t. alþjóðakóðar	

2. HLUTI

Skipulag og ábyrgð viðurkennds umboðsaðila í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar

Markmið: Hvorki skal flytja farm né póst með flugi til ESB eða EES án þess að hann sæti flugverndarráðstöfunum. Aðeins má samþykkja farm eða póst, sem RA3-umboðsaðili afhendir ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila, sem verndaðan farm eða póst ef RA3-umboðsaðilinn hefur framkvæmt slíkar flugverndarráðstafanir. Nánari upplýsingar um slíkar ráðstafanir er að finna í eftirfarandi hlutum þessa gátlista.

RA3-umboðsaðilinn skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að viðeigandi flugverndarráðstöfunum sé beitt vegna alls farms og pósts, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, og að verndaður farmur eða póstur sé varinn þar til hann er afhentur ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila. Flugverndarráðstafanir skulu samanstanda af einu af eftirfarandi:

a) handleit sem skal vera fullnægjandi svo hægt sé að tryggja, með nokkurri vissu, að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni,

b) öðrum flugverndarráðstöfunum, sem eru hluti af verndarferli birgðakeðju, þannig að hægt sé að tryggja, með nokkurri vissu, að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni og sem annar RA3-umboðsaðili, KC3-sendandi eða AC3-sendandi, sem RA3-umboðsaðilinn tilnefnir, hefur beitt.

Tilvísun: liður 6.8.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

2.1. Hefur einingin komið á fót flugverndaráætlun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal fara beint í lið 2.5.	

2.2. Flugverndaráætlun einingar

Dagsetning – nota skal nákvæmt snið fyrir dagsetningar dd/mm/áááá	
Útgáfa	
Hefur flugverndaráætlun verið lögð fram og/eða samþykkt af hlutaðeigandi yfirvaldi í ríki einingarinnar? Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu:	

2.3. Tekur flugverndaráætlunin nægilega vel til þáttanna sem taldir eru upp í 3.–9. hluta gátlistans?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra það og tilgreina ástæður	

2.4. Er flugverndaráætlunin endanleg, traust og fullgerð?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður	

2.5. Hefur einingin komið á ferli til að tryggja að flugfarmur eða flugpóstur sæti viðeigandi flugverndarráðstöfunum áður en hann er afhentur ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu	

2.6. Er stjórnunarkerfi hjá einingunni (t.d. stjórntæki, leiðbeiningar) til að tryggja að flugverndarráðstafanir, sem krafist er, séu framkvæmdar?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa stjórnunarkerfinu og útskýra hvort hlutaðeigandi yfirvald eða önnur eining samþykkir það, hafi með því eftirlit eða lætur það í té.	
Ef svarið er NEI, skal útskýra hvernig einingin tryggir að flugverndarráðstafanir séu framkvæmdar á tilskilinn hátt.	

2.7. Niðurstöður og almennar athugasemdir um hvort ferlið sé áreiðanlegt, endanlegt og traust.

Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

3. HLUTI

Ráðning og þjálfun starfsfólks

Markmið: Til að tryggja að tilskildum flugverndarráðstöfunum sé beitt skal RA3-umboðsaðilinn fela ábyrgu og hæfu starfsfólki að starfa á sviði verndunar flugfarms eða flugpósts. Starfsfólk, sem hefur aðgang að vernduðum flugfarmi, verður að hafa tilskilda hæfni til að gegna skyldustörfum sínum og skal hafa fengið viðeigandi þjálfun.

Til að ná því markmiði skal RA3-umboðsaðilinn hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að allt starfsfólk (t.d. fastráðið, í tímabundnu starfi, afleysingafólk, bílstjórar), sem hefur beinan aðgang án fylgdar að flugfarmi eða flugpósti sem sætir eða hefur sætt flugverndarráðstöfunum:

a) hafi verið látið sæta grunn- og reglubundnu eftirliti, í aðdraganda ráðningar, eða bakgrunnsskoðun, sem er a.m.k. í samræmi við kröfur sem staðaryfirvöld gera til athafnasvæðis RA3-umboðsaðilans sem hefur fengið fullgildingu, og

b) hafi lokið grunn- og reglubundinni þjálfun í flugvernd til að vera meðvitað um þá ábyrgð sem það ber, með tilliti til flugverndar, í samræmi við kröfur sem staðaryfirvöld gera til athafnasvæðis RA3-umboðsaðilans sem hefur fengið fullgildingu.

Athugasemd:

— Bakgrunnsskoðun felur í sér athugun á deili einstaklings og fyrri reynslu hans, þ.m.t., ef lög heimila það, á mögulegum afbrotaferli hans sem er hluti af mati á hæfi einstaklingsins til að framkvæma flugverndarráðstafanir og/eða að fá aðgang án fylgdar að haftasvæðum flugverndar (skilgreining í 17. viðauka Alþjóðaflugmálastofnunarinnar).

— Við athugun í aðdraganda ráðningar skal staðfesta deili á einstaklingnum á grundvelli skjalfestra sönnunargagna, fara yfir ráðningarsögu, menntun og hvers konar starfsrof a.m.k. næstliðin fimm ár ásamt því að fara fram á að einstaklingurinn undirriti yfirlýsingu um hugsanlegan afbrotaferil í öllum búseturíkjum a.m.k. næstliðin fimm ár (skilgreining Sambandsins).

Tilvísun: liður 6.8.3.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

3.1. Er verklag fyrir hendi sem tryggir að allt starfsfólk, sem hefur beinan aðgang án fylgdar að vernduðum flugfarmi eða flugpósti, sæti athugun í aðdraganda ráðningar þar sem lagt er mat á bakgrunn þess og hæfni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal tilgreina þann fjölda næstliðinna ára sem tekið er tillit til við athugun í aðdraganda ráðningar og tilgreina hvaða eining framkvæmir athugunina.	

3.2. Felur þetta verklag í sér?

☐ bakgrunnsskoðun	
☐ athugun í aðdraganda ráðningar	
☐ athugun á sakaskrá	
☐ viðtöl	
☐ annað (nánari upplýsingar)	
Gera skal grein fyrir framangreindum þáttum, tilgreina hvaða eining framkvæmir þennan þátt og, eftir atvikum, næstliðið tímabil sem tekið er til athugunar.	

3.3. Er verklag fyrir hendi sem tryggir að einstaklingur, sem ber ábyrgð á beitingu og umsjón með framkvæmd flugverndarráðstafana á starfsstöð, sæti athugun í aðdraganda ráðningar þar sem lagt er mat á bakgrunn hans og hæfni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal tilgreina þann fjölda næstliðinna ára sem tekið er tillit til við athugun í aðdraganda ráðningar og tilgreina hvaða eining framkvæmir athugunina.	

3.4. Felur þetta verklag í sér?

☐ bakgrunnsskoðun

☐ athugun í aðdraganda ráðningar

☐ athugun á sakaskrá

☐ viðtöl

☐ annað (nánari upplýsingar)

Gera skal grein fyrir framangreindum þáttum, tilgreina hvaða eining framkvæmir þennan þátt og, eftir atvikum, næstliðið tímabil sem tekið er til athugunar.

3.5. Fær starfsfólk, sem hefur beinan aðgang án fylgdar að vernduðum flugfarmi eða flugpósti, þjálfun í flugvernd áður en það fær þennan aðgang?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa inntaki og lengd þjálfunarinnar	
3.6. Fær starfsfólk, sem tekur á móti, skimar eða ver flugfarm eða flugpóst, sérstaka starfstengda þjálfun?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa inntaki og lengd þjálfunarnámskeiðanna.	
3.7. Fær starfsfólkið, sem um getur í liðum 3.5 og 3.6, reglubundna þjálfun?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal tilgreina þætti og tíðni reglubundnu þjálfunarinnar	
3.8. Niðurstaða: tryggja ráðstafanir, sem gerðar eru vegna ráðningar og þjálfunar starfsfólks, að allt starfsfólk, sem hefur aðgang að vernduðum flugfarmi eða flugpósti, hafi verið ráðið til starfa með tilhlýðilegum hætti og að það hafi hlotið fullnægjandi þjálfun til að það geri sér grein fyrir þeirri ábyrgð sem það ber með tilliti til flugverndar?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

4. HLUTI

Verklag um móttöku

Markmið: RA3-umboðsaðilinn getur tekið við farmi eða pósti frá öðrum RA3-umboðsaðila, KC3-sendanda, AC3-sendanda eða frá óþekktum sendanda. RA3-umboðsaðilinn skal hafa fyrir hendi viðeigandi verklag um móttöku farms og pósts til að staðfesta hvort sendingin komi frá verndaðri birgðakeðju eða ekki og síðan hvaða verndarráðstafanir þurfi að gilda um hana.

Þegar RA3-umboðsaðilinn tekur við sendingum skal hann athuga stöðu einingarinnar sem hann fær sendingarnar frá og sannprófa að einstakt alstafakennimerki (UAI) einingarinnar, sem afhendir sendinguna, sé tilgreint í meðfylgjandi gögnum, og staðfesta að flugrekandinn eða einingin, sem afhendir sendingarnar, sé skráð sem virk í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju fyrir tilgreinda flugvöllinn eða starfsstöðina, eins og við á.

Ef einstaka alstafamerkið er ekki tilgreint í gögnunum eða ef staða flugrekanda eða einingar í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju er ekki virk skal RA3-umboðsaðilinn meðhöndla sendingarnar eins og þær hafi komið frá óþekktum sendanda.

Að auki skal RA3-umboðsaðili halda gagnagrunn þar sem finna má a.m.k. eftirfarandi upplýsingar um hvern viðurkenndan umboðsaðila eða þekktan sendanda, sem hlotið hefur ESB-fullgildingu flugverndar í samræmi við lið 6.8.5.1 og sem RA3-umboðsaðilinn tekur á móti farmi eða pósti frá með beinum hætti, sem afhenda á ACC3-flugrekanda með tilliti til flutnings inn í Sambandið:

a) upplýsingar um fyrirtækið, þ.m.t. áreiðanlegt heimilisfang fyrirtækisins,

b) hvers eðlis fyrirtækið er, að undanskildum viðkvæmum viðskiptaupplýsingum,

c) tengiliðaupplýsingar, þ.m.t. tengiliðaupplýsingar um einstakling eða einstaklinga sem bera ábyrgð á flugvernd,

d) skráningarnúmer fyrirtækisins, ef við á,

e) fullgildingarskýrslu, þar sem hún liggur fyrir,

f) hið einstaka alstafakennimerki sem úthlutað var í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju.

Tilvísun: liðir 6.8.3.1, 6.8.3.5, og 6.8.5.4 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

Athugasemd: RA3-umboðsaðili má aðeins taka við farmi frá AC3-sendanda sem vernduðum farmi ef þessi RA3-umboðsaðili hefur sjálfur tilnefnt þennan sendanda sem AC3-sendanda, í samræmi við c-lið liðar 6.8.3.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998, og gerir grein fyrir farminum sem þessi sendandi afhendir.

4.1. Staðfestir einingin hvort sending, sem hún tekur við, kemur frá öðrum RA3-umboðsaðila, KC3-sendanda, AC3-sendanda eða óþekktum sendanda?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig er því háttað?	

4.2. Sannprófar einingin tilgreiningu einstaka alstafamerkisins í gögnunum sem fylgja sendingum frá öðrum ACC3-flugrekanda, RA3-umboðsaðila eða KC3-sendanda og staðfestir hún virka ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu hans í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju?

JÁ eða NEI	

4.3. Hefur einingin fyrir hendi verklag til að tryggja að ef gögnin innihalda ekki einstaka alstafamerkið eða ef einingin, sem sendingin kom frá, hefur ekki virka stöðu í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju, sé sendingin meðhöndluð sem sending með óþekktan uppruna?

JÁ eða NEI	

4.4. Tilnefnir einingin sendendur sem AC3-sendendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa verklaginu og verndarráðstöfunum sem einingin krefst af sendandanum.	

4.5. Þegar eining tekur á móti sendingu, gengur hún úr skugga um hvort ákvörðunarstaður hennar sé flugvöllur í ESB eða EES?

JÁ eða NEI — nánari útskýring	

4.6. Ef svarið er JÁ — lætur einingin þá allan flugfarm eða flugpóst sæta sömu flugverndarráðstöfunum þegar ákvörðunarstaðurinn er flugvöllur í ESB eða EES?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa verklaginu	

4.7. Þegar eining tekur á móti sendingu, gengur hún þá úr skugga um hvort meðhöndla eigi sendinguna sem farm eða póst sem mikil áhætta fylgir (HRCM) (sjá skilgreiningu í 6. hluta), þ.m.t. sendingar sem flytja á með öðrum hætti en með flugi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig er því háttað? Lýsa skal verklaginu	

4.8. Þegar eining, sem fengið hefur fullgildingu, tekur á móti verndaðri sendingu, gengur hún þá úr skugga um hvort hún hafi verið varin gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hennar sé rofin?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa aðferðinni sem var notuð (t.d. hvort notuð voru innsigli, lásar, skoðun)	
4.9. Er þess krafist að einstaklingurinn, sem afhendir sendinguna, leggi fram opinbert auðkennisskírteini með mynd?	
JÁ eða NEI	
4.10. Er ferli í notkun til að auðkenna sendingar þar sem krafist er skimunar?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig er því háttað?	
4.11. Niðurstaða: Er verklag um móttöku fullnægjandi til að ganga úr skugga um hvort farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, komi frá verndaðri birgðakeðju eða hvort þörf sé á að skima hann?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar.	

5. HLUTI

Skimun

Markmið: Þegar RA3-umboðsaðili tekur við farmi og pósti, sem kemur ekki frá verndaðri birgðakeðju, þarf RA3-umboðsaðilinn að skima þessar sendingar með viðeigandi hætti áður en hægt er að afhenda þær ACC3-flugrekanda sem verndaðan farm. RA3-umboðsaðilinn skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að farmur eða póstur sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, vegna flugskipta, gegnumferðar eða affermingar á flugvelli í Sambandinu, sé skimaður með því að nota úrræðin eða aðferðirnar, sem um getur í löggjöf Sambandsins, þannig að tryggt sé, með nokkurri vissu, að hann innihaldi enga bannaða hluti.

Ef hlutaðeigandi yfirvald í þriðja landi eða einhver fyrir þess hönd framkvæmir skimun á flugfarmi eða flugpósti skal RA3-umboðsaðili greina frá þeirri staðreynd og tilgreina með hvaða hætti fullnægjandi skimun er tryggð.

Tilvísun: liður 6.8.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

5.1. Sér önnur eining um skimun fyrir hönd einingarinnar?	
JÁ eða NEI	
Ef JÁ: Tilgreina skal eðli þessara eininga og veita nánari upplýsingar um þær: — einkarekið skimunarfyrirtæki, — ríkisrekið fyrirtæki, — ríkisrekin aðstaða eða aðili á vegum ríkisins sem annast skimun, — annað. Tilgreina skal eðli samkomulags eða samnings á milli einingarinnar, sem hefur fengið fullgildingu, og einingarinnar sem sér um skimunina fyrir hennar hönd.	

5.2. Getur einingin óskað eftir viðeigandi flugverndarráðstöfunum ef skimun er framkvæmd af einni af framangreindum einingum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal veita nánari upplýsingar.	

5.3. Hvaða gerninga og stjórntæki (t.d. umsjón, vöktun og gæðaeftirlit) notar einingin til að sjá til þess að slíkir þjónustuveitendur beiti flugverndarráðstöfunum á þann hátt sem krafist er?

5.4. Hvaða aðferðir eru notaðar við að skima flugfarm og flugpóst?

Tilgreina skal aðferðirnar, þ.m.t. upplýsingar um búnað sem notaður er til að skima flugfarm og flugpóst (t.d. framleiðanda, tegund, útgáfu hugbúnaðar, staðla, raðnúmer) fyrir allar aðferðirnar sem notaðar eru.	

5.5. Er búnaðurinn eða aðferðin, (t.d. sprengjuleitarhundar) sem notuð er, í nýjustu skrá yfir búnað og aðferðir sem uppfylla kröfur ESB, Evrópusambands flugmálastjórna (ECAC) eða Öryggisstjórnar samgöngumála í Bandaríkjunum (TSA)?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal veita nánari upplýsingar	
Ef svarið er NEI, skal veita nánari upplýsingar þar sem tilgreint er samþykki fyrir búnaði og dagsetningu þess, sem og allt sem bendir til þess að búnaðurinn uppfylli kröfur ESB um búnað.	

5.6. Er búnaðurinn notaður í samræmi við notkunarleiðbeiningar (e. *concept of operation* – CONOPS) framleiðanda og er hann prófaður reglulega og haldið við?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu	

5.7. Ef sprengjuleitahundar eru notaðir, gangast þeir þá undir ferli grunnþjálfunar og reglubundinnar þjálfunar, viðurkenningu og gæðaeftirlit samkvæmt staðli sem samsvarar kröfum ESB eða Öryggisstjórnar samgöngumála í Bandaríkjunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa öllu ferlinu og tilheyrandi gögnum sem styðja matið.	

5.8. Ef sprengjuleitahundar eru notaðir fylgir skimunarferlið þá innsetningaraðferð sem jafngildir kröfum ESB eða Öryggisstjórnar samgöngumála í Bandaríkjunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa öllu ferlinu og tilheyrandi gögnum sem styðja matið.	

5.9. Er tekið tillit til þess hvers eðlis sendingin er við skimun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa hvernig tryggt sé að aðferðin, sem valin er til skimunar, sé fullnægjandi til að tryggja, með nokkurri vissu, að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni.	

5.10. Er ferli í notkun sem fylgja á ef skimunarbúnaður gefur frá sér viðvörun? Í sumum búnaði, t.d. röntgenbúnaði, setur rekstraraðilinn sjálfur viðvörunina í gang.

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu, sem fylgja á þegar viðvörun er gefin, til að tryggja, með nokkurri vissu, að um enga bannaða hluti sé að ræða.	
Ef svarið er NEI, skal útskýra hvað verður um sendinguna	

5.11. Eru einhverjar sendingar undanþegnar öryggisleit?

JÁ eða NEI	

5.12. Eru einhverjar undanþágur sem samrýmast ekki skrá Sambandsins?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal gefa nánari upplýsingar	

5.13. Er aðgangi að skimunarsvæði stýrt til að tryggja að einungis starfsfólk, sem hefur heimild og hefur hlotið þjálfun, hafi aðgang að því?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

5.14. Er viðhöfð virk gæðastjórnun og/eða prófunarfyrirkomulag?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

5.15. Niðurstaða: Er allur flugfarmur eða flugpóstur skimaður með einu af þeim úrræðum eða aðferðum sem taldar eru upp í lið 6.2.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998, þannig að tryggt sé, með nokkurri vissu, að ekki sé um að ræða neina bannaða hluti?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

6. HLUTI

Farmur eða póstur sem mikil áhætta fylgir

Markmið: Ef sendingar koma upphaflega frá tilteknum stöðum eða hafa flugskipti á tilteknum stöðum, sem eru skilgreindir þannig að mikil áhætta fylgi þeim samkvæmt Sambandinu, eða svo virðist sem vernd sendinganna hafi verið verulega rofin ber að meðhöndla þær sem farm eða póst sem mikil áhætta fylgir (HRCM). Slíkar sendingar þarf að skima í samræmi við sérstök fyrirmæli. RA3-umboðsaðilinn skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að farmur eða póstur, sem flytja á til ESB eða EES og mikil áhætta fylgir, sé auðgreindur sem og að hann sæti viðeigandi flugverndarráðstöfunum eins og skilgreint er í löggjöf Sambandsins.

ACC3-flugrekandi, sem RA3-umboðsaðili afhendir flugfarm eða flugpóst til flutnings, skal hafa heimild til að gefa RA3-umboðsaðilanum nýjustu og viðeigandi upplýsingar um upprunastaði sem mikil áhætta fylgir.

RA3-umboðsaðilinn skal gera sömu ráðstafanir, hvort sem hann tekur við farmi og pósti sem mikil áhætta fylgir, frá flugrekanda eða með öðrum flutningsmáta.

Tilvísun: liður 6.7 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

Athugasemd: Farmur eða póstur, sem mikil áhætta fylgir, og heimild hefur verið gefin að fluttur verði til ESB/EES, skal fá útgefna stöðu flugverndar „SHR“, sem þýðir að sendingin telst örugg fyrir flutning með farþega-, vöru- og póstloftfari í samræmi við kröfur um sendingar sem mikil áhætta fylgir.

6.1. Veit starfsfólk, sem ber ábyrgð á flugverndarráðstöfunum, hvaða flugfarm og flugpóst ber að meðhöndla sem farm og póst sem mikil áhætta fylgir?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

6.2. Er verklag fyrir hendi hjá einingunni um hvernig skuli auðgreina farm og póst sem mikil áhætta fylgir?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

6.3. Fellur farmur og póstur, sem mikil áhætta fylgir, undir verklag um skimun farms og pósts, sem mikil áhætta fylgir, samkvæmt löggjöf Sambandsins?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina hvaða verklagi skuli beitt	

6.4. Gefur einingin, að skimun lokinni, út yfirlýsingu um stöðu flugverndar „SHR“ í gögnum sem fylgja sendingunni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því hvernig staða flugverndar er gefin út og í hvaða skjali	

6.5. Niðurstaða: Er ferlið, sem einingin hefur komið á, viðeigandi og fullnægjandi til að tryggja að allur farmur og póstur, sem mikil áhætta fylgir, hafi hlotið viðeigandi meðhöndlun áður en hann er settur um borð í loftfar?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar.	

7. HLUTI

Vörn fyrir verndaðan flugfarm og flugpóst

Markmið: RA3-umboðsaðili skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að farmur og/eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi og/eða gegn því að vernd hans verði rofin, frá því að öryggisleit eða aðrar flugverndarráðstafanir voru gerðar eða frá því að tekið er við honum, eftir að hann hefur farið í gegnum skimun eða sætt flugverndarráðstöfunum og þar til hann er settur um borð í loftfar eða afhentur ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila. Ef flugfarmur og flugpóstur, sem áður var verndaður, er ekki varinn eftir það er ekki heimilt að setja hann um borð í loftfar eða afhenda hann ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm eða póst.

Veita má vörn með því að nota mismunandi úrræði, s.s. efnisleg úrræði (t.d. fyrirstöður, læst herbergi), mannleg úrræði (t.d. eftirlitsferðir, þjálfað starfsfólk) og tæknileg úrræði (t.d. eftirlitsmyndavélar (CCTV), innbrotsviðvörunarkerfi).

Verndaður farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, skal vera aðskilinn frá öðrum flugfarmi eða flugpósti sem ekki er verndaður.

Tilvísun: liður 6.8.3.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

7.1. Gerir önnur eining ráðstafanir til að verja verndaðan flugfarm og flugpóst fyrir hönd einingarinnar sem hefur fengið fullgildingu?

JÁ eða NEI	
Ef JÁ: Tilgreina skal eðli þessara eininga og veita nánari upplýsingar um þær: — einkarekið skimunarfyrirtæki, — ríkisrekið fyrirtæki, — ríkisrekin aðstaða eða aðili á vegum ríkisins sem annast skimun, — annað.	

7.2. Eru viðhafðar flugverndarráðstafanir og vörn til að koma í veg fyrir að vernd flugfarmsins eða flugpóstsins verði rofin meðan á skimun stendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því Tilgreina skal hvaða tegund eða tegundum varna er beitt: — efnislegum vörnum (t.d. girðingu, fyrirstöðu, traustbyggðri byggingu), — mannlegum vörnum (t.d. eftirlitsferðum o.s.frv.), — tæknilegum vörnum (t.d. eftirlitsmyndavélum, viðvörunarkerfi). Gerið skal grein fyrir því hvernig þær eru skipulagðar.	

7.3. Hafa einungis starfsmenn með aðgangsheimild aðgang að vernduðum flugfarmi eða flugpósti?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því Tilgreina skal hvernig eftirliti er háttað með öllum aðgangsleiðum (þ.m.t. dyrum og gluggum) að auðgreinanlegum og vernduðum flugfarmi eða flugpósti.	

7.4. Er verklag fyrir hendi, sem tryggir að farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES og fellur undir flugverndarráðstafanir, sé varinn gegn óheimilum aðgangi frá því hann hefur verið verndaður og þar til hann er settur um borð í loftfar eða afhentur ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því hvernig hann er varinn (t.d. með efnislegum, mannlegum eða tæknilegum úrræðum). Tilgreina skal einnig hvort byggingin sé traustbyggð og hvaða efni eru notuð, ef þessar upplýsingar eru tiltækar.	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	

7.5. Niðurstaða: Eru ráðstafanir, sem gerðar eru til að verja sendingar, nægilega traustar til að koma í veg fyrir ólöglegt athæfi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

8. HLUTI

Gögn

Markmið: RA3-umboðsaðilinn skal sjá til þess að í gögnunum, sem fylgja sendingu sem hann hefur viðhaft flugverndarráðstafanir gagnvart (t.d. skimun, vernd), komi a.m.k. fram:

a) einstaka alstafakennimerkið, sem hlutaðeigandi yfirvald sem veitir tilnefningu, úthlutaði og

b) einstakt kennimerki sendingarinnar, s.s. númer á (grunn- eða aðal-) flugfarmbréfi, þegar við á, og

c) innihald sendingarinnar og

d) verndarstaðan, sem er tilgreind eins og hér greinir:

— „SPX“: sending telst örugg til flutnings með farþega-, farm- og póstloftfari eða

— „SCO“: sending telst einungis örugg til flutnings með farm- og póstloftfari eða

— „SHR“: sending telst örugg til flutnings með farþega-, farm- og póstloftfari í samræmi við kröfur um mikla áhættu.

Ef RA3-umboðsaðilinn gefur út flugverndarstöðuna skal einingin, þar að auki, tilgreina ástæðurnar fyrir útgáfu hennar, s.s. úrræði eða aðferð sem var notuð við skimun, eða ástæðu þess að sendingunni var veitt undanþága frá skimun, með því að nota staðlana sem voru samþykktir í áætluninni um yfirlýsingu um flugvernd sendinga.

Gögnin sem fylgja sendingunni geta annaðhvort verið flugfarmbréf, sambærileg póstskjöl eða sérstök yfirlýsing, og annaðhvort verið á rafrænu eða skriflegu formi.

Tilvísun: d-liður liðar 6.3.2.6, liðir 6.8.3.4, 6.8.3.5 og 6.8.3.6 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998

8.1. Sér einingin til þess að viðeigandi fylgigögn séu gefin út og að þau innihaldi upplýsingarnar sem krafist er í d-lið liðar 6.3.2.6, liðum 6.8.3.4, 6.8.3.5 og 6.8.3.6 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju svo er ekki	

8.2. Einkum, tilgreinir einingin verndarstöðu farmsins og hvernig þeirri stöðu var náð?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju svo er ekki	

8.3. Niðurstaða: Er gagnaferlið fullnægjandi til að tryggja að farmi eða pósti fylgi viðeigandi gögn þar sem tilgreind er rétt verndarstaða og allar upplýsingar sem krafist er?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

9. HLUTI

Flutningar

Markmið: Verja verður flugfarm og flugpóst gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin frá því að hann hefur verið verndaður og þar til hann er settur um borð í loftfar eða afhentur ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila. Þetta felur í sér vörn meðan á flutningi til loftfars, til ACC3-flugrekanda eða annars RA3-umboðsaðila stendur. Ef flugfarmur og flugpóstur, sem þegar hefur verið verndaður, er ekki varinn meðan á flutningi stendur er ekki heimilt að setja hann um borð í loftfar eða afhenda hann ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm.

Meðan á flutningi til loftfars, ACC3-flugrekanda eða annars RA3-umboðsaðila stendur er RA3-umboðsaðilinn ábyrgur fyrir að verja verndaðar sendingar. Þetta felur m.a. í sér tilvik þegar önnur eining sér um flutninginn fyrir hans hönd, eins og t.d. farmmiðlari. Þetta á ekki við um tilvik þegar sendingar eru fluttar á ábyrgð ACC3-flugrekanda eða annars RA3-umboðsaðila.

Tilvísun: liður 6.8.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

9.1. Hvernig er flugfarmur eða flugpóstur fluttur til ACC3-flugrekanda eða annars RA3-umboðsaðila?

a) Sér einingin, sem hefur fengið fullgildingu, sjálf um flutninginn?

JÁ eða NEI	

b) Annast annar RA3-umboðsaðili eða ACC3-flugrekandi flutninginn?

JÁ eða NEI	

c) Notar einingin, sem hefur fengið fullgildingu, verktaka?

JÁ eða NEI	

9.2. Er flugfarminum eða flugpóstinum pakkað þannig að augljóst sé hvort vernd hans hafi verið rofin?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig?	

9.3. Er ökutækið innsiglað eða því læst áður en flutningur á því hefst?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig?	

9.4. Í þeim tilvikum sem innsiglisnúmer eru notuð er þá aðgangi að innsiglum stýrt og eru númerin skráð?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er já skal tilgreina hvernig:	

9.5. Skrifar viðkomandi farmflytjandi undir yfirlýsingu farmflytjanda, ef við á?

JÁ eða NEI	

9.6. Hefur einstaklingur, sem flytur farminn, gengist undir sérstaka þjálfun í flugverndarráðstöfunum og flugverndarvitund áður en honum var heimilað að flytja verndaðan flugfarm eða flugpóst eða hvort tveggja?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa viðkomandi tegund flugverndarráðstafana (t.d. athugun í aðdraganda ráðningar, bakgrunnsskoðun) og tegund þjálfunar (t.d. þjálfun í flugverndarvitund) sem um er að ræða.	

9.7. Niðurstaða: Eru ráðstafanir fullnægjandi til að verja flugfarm eða flugpóst gegn óheimilum aðgangi meðan á flutningi stendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

10. HLUTI

Reglufylgni

Markmið: Eftir að hafa lagt mat á 1.-9. hluta þessa gátlista skal ESB-matsmaður flugverndar ákvarða hvort sannprófun á starfsstöð staðfesti framkvæmd flugverndarráðstafana í samræmi við markmið þessa gátlista fyrir farm eða póst sem fluttur er með flugi til ESB eða EES.

Tvær atburðarásir eru mögulegar. ESB-matsmaður flugverndar kemst að þeirri niðurstöðu að einingunni:

1. hafi tekist að ná markmiðunum sem um getur í þessum gátlista; fullgildingarskýrsluna skal afhenda hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, og einingunni, sem hefur fengið fullgildingu, innan eins mánaðar hið lengsta eftir að sannprófun á starfsstöð hefur farið fram;

2. hafi ekki tekist að ná markmiðunum sem um getur á þessum gátlista. Í slíku tilviki er einingunni ekki heimilt að afhenda ACC3-flugrekanda eða öðrum RA3-umboðsaðila verndaðan farm eða póst sem fluttur er með flugi til ákvörðunarstaðar í ESB eða EES. Einingin skal fá eintak af fullgerðum gátlista þar sem frávikin koma fram.

10.1. Almennar niðurstöður: Tilgreina skal tilvikið sem best samsvarar aðstæðunum sem hafa fengið fullgildingu	
1 eða 2	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	
Athugasemdir frá einingunni	

Nafn matsmanns:

Dagsetning:

Undirskrift:

———

VIÐAUKI

Skrá yfir einstaklinga og einingar sem hafa verið heimsótt og viðtöl tekin við

Tilgreina skal heiti einingar, nafn og stöðu tengiliðar og hvenær heimsókn eða viðtal fór fram.

Heiti einingar	Nafn tengiliðar	Staða tengiliðar	Dagsetning heimsóknar eða viðtals

FYLGISKJAL 6-C3

GÁTLISTI FYRIR FULLGILDINGU FYRIR ACC3-FLUGREKENDUR

Tilnefning sem ACC3-flugrekandi (*flugrekandi sem flytur farm eða póst með flugi til Evrópusambandsins frá flugvelli í þriðja landi*) er forsenda þess að geta flutt farm eða póst með flugi til Evrópusambandsins ([1]) (ESB) eða Íslands, Noregs og Sviss og gerð er krafa um hana samkvæmt framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

ACC3-tilnefning er grundvallarskilyrði fyrir öll flug sem flytja farm eða póst sem fer í flugskipti, gegnumferð eða affermingu á flugvöllum í ESB eða EES ([2]). Hlutaðeigandi yfirvöld aðildarríkja Evrópusambandsins, Íslands, Noregs og Sviss bera hvert fyrir sig ábyrgð á tilnefningu tiltekinna flugrekenda sem ACC3-flugrekenda. Tilnefningin er byggð á flugverndaráætlun flugrekanda og sannprófun á starfsstöð í tengslum við það hvort framkvæmd samrýmist markmiðunum sem um getur í þessum gátlista fyrir fullgildingu.

Gátlistinn er stjórntæki sem ESB-matsmaður flugverndar á að nota til að meta verndarstig flugfarms eða flugpósts sem ACC3-flugrekandinn eða flugrekandi, sem sótt hefur um ACC3-tilnefningu, flytur með flugi til ESB eða EES eða er ábyrgur fyrir flutningnum.

Fullgildingarskýrsluna skal afhenda hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, og einingunni, sem hefur fengið fullgildingu, innan eins mánaðar hið lengsta eftir að sannprófun á starfsstöð hefur farið fram. Óaðskiljanlegir hlutar fullgildingarskýrslu skulu a.m.k. vera:

— fullgerður gátlisti, undirritaður af ESB-matsmanni flugverndar og, eftir atvikum, með athugasemdum frá einingunni sem hefur fengið fullgildingu og

([1]) Aðildarríki Evrópusambandsins: Austurríki, Belgía, Búlgaría, Króatía, Kýpur, Tékkland, Danmörk, Eistland, Finnland, Frakkland, Þýskaland, Grikkland, Ungverjaland, Írland, Ítalía, Lettland, Litháen, Lúxemborg, Malta, Holland, Pólland, Portúgal, Rúmenía, Slóvakía, Slóvenía, Spánn, Svíþjóð og Bretland.

([2]) Þegar þessi gátlisti um fullgildingu varðar flugfarm eða flugpóst eða loftfar þar sem ákvörðunarstaðurinn er ESB eða EES, varðar hann að sama skapi flugfarm eða flugpóst eða loftfar þar sem ákvörðunarstaðurinn er ESB sem og Ísland, Noregi og Sviss.

— yfirlýsing um skuldbindingar (fylgiskjal 6-H1 við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998), undirrituð af einingunni sem hefur fengið fullgildingu og

— yfirlýsing um sjálfstæði (fylgiskjal 11-A við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998), að því er varðar einingunа, sem hefur fengið fullgildingu, sem ESB-matsmaður flugverndar hefur undirritað.

Númeraröð blaðsíðna, dagsetning ESB-fullgildingar flugverndar og merking hverrar blaðsíðu með upphafsstöfum matsmanns og einingarinnar, sem hefur fengið fullgildingu, skulu sýna fram á heildarsamfellu fullgildingarskýrslunnar. Fullgildingarskýrslan skal ávallt vera á ensku.

Meta skal 3. hluta — Flugverndaráætlun flugrekanda, 6. hluta — Gagnagrunnur, 7. hluta — Skimun og 8. hluta — Farmur eða póstur sem mikil áhætta fylgir, miðað við kröfurnar í liðum 6.7 og 6.8 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998. Að því er varðar aðra hluta fela grunnkröfur í sér kröfur og ráðlagðar starfsvenjur í 17. viðauka við Chicago-samninginn um alþjóðlegt almenningsflug og leiðbeiningar sem finna má í handbók Alþjóðaflugmálastofnunarinnar um flugvernd (skjal nr. 8973-takmörkuð dreifing).

Athugasemdir til útskýringar:

— Fylla verður út alla gildandi og viðeigandi hluta gátlistans í samræmi við viðskiptalíkan og starfsemi einingarinnar sem á að fullgilda. Ef engar upplýsingar eru fáanlegar verður að gera grein fyrir því.

— Að loknum hverjum hluta skal ESB-matsmaður flugverndar komast að niðurstöðu um það hvort og að hve miklu leyti markmið þessa hluta hafi náðst.

1. HLUTI

Auðkenning einingarinnar, sem hefur fengið fullgildingu, og deili á matsmanni

1.1. Dagsetning eða dagsetningar fullgildingar	
Nota skal nákvæmt snið fyrir dagsetningar, s.s. 01.10.2012–02.10.2012	
dd/mm/áááá	
1.2. Dagsetning fyrri fullgildingar og einstakt alstafakennimerki (UAI) ACC3-flugrekandans, ef slíkt liggur fyrir	
dd/mm/áááá	
Einstakt alstafakennimerki	
1.3. Upplýsingar um matsmann flugverndar	
Nafn	
Fyrirtæki/stofnun/yfirvald	
Einstakt alstafakennimerki	
Tölvupóstfang	
Símanúmer — þ.m.t. alþjóðakóðar	
1.4. Nafn flugrekanda sem á að fullgilda	
Nafn	

Flugrekandaskírteini (AOC) gefið út í (nafn ríkis):	
Kóði Alþjóðasambands flugfélaga (IATA) eða kóði Alþjóðaflugmálastofnunarinnar (ICAO) ef kóði Alþjóðasambands flugfélaga er ekki til fyrir flugrekandann. Tilgreina skal hvor kóðinn gildir.	
Ríkið sem ber ábyrgð á tilnefningu flugrekanda sem ACC3-flugrekanda	

1.5. Upplýsingar um staðsetningu flugvalla í þriðja landi, sem á að fullgilda, eða farm- eða póststöðva sem tengjast þeim

Heiti	
Kóði Alþjóðasambands flugfélaga eða Alþjóðaflugmála-stofnunarinnar fyrir flugvöllinn	
Land	

1.6. Eðli viðskipta flugrekandans — Það getur verið um að ræða fleiri en eina tegund viðskipta

a) flugrekandi sem flytur farþega og farm eða póst, b) flugrekandi sem flytur aðeins farm og póst, c) flugrekandi sem flytur aðeins farm, d) flugrekandi sem flytur aðeins póst, e) samræmingaraðili (e. *integrator*), f) leigusali (e. *charter*).	

1.7. Nafn og titill einstaklings sem ber ábyrgð á vernd flugfarms eða flugpósts frá þriðja landi

Nafn	
Starfsheiti	
Tölvupóstfang	
Símanúmer — þ.m.t. alþjóðakóðar	

1.8. Heimilisfang aðalskrifstofu flugrekanda á flugvellinum sem heimsóttur er.

Númer/deild/bygging/flugvöllur	
Gata	
Bæjarfélag	
Póstnúmer	
Ríki (ef við á)	
Land	

1.9. Heimilisfang aðalskrifstofu flugrekanda, t.d. höfuðstöðvar fyrirtækisins

Númer/deild/bygging/flugvöllur	
Gata	
Bæjarfélag	
Póstnúmer	
Ríki (ef við á)	
Land	

2. HLUTI

Skipulag og ábyrgð ACC3-flugrekanda á flugvellinum

Markmið: Hvorki skal flytja farm né póst til ESB eða EES nema hann sæti flugverndarráðstöfunum. Nánari upplýsingar um slíkar ráðstafanir er að finna í eftirfarandi hlutum þessa gátlista. ACC3-flugrekandinn skal ekki taka við farmi eða pósti til flutnings með loftfari til ESB nema viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar, þekktur sendandi með ESB-fullgildingu flugverndar eða skráður sendandi, sem hann sjálfur eða viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar tilnefndi, geti staðfest og gert grein fyrir notkun skimunar eða annarra flugverndarráðstafana eða slíkar sendingar verði skimaðar í samræmi við löggjöf Sambandsins.

ACC3-flugrekandinn skal koma á ferli til að tryggja að viðeigandi flugverndarráðstafanir séu viðhafðar vegna flugfarms og flugpósts sem fluttur er til ESB eða EES nema hann sé undanþeginn skimun, í samræmi við löggjöf Sambandsins, og að þessi farmur eða póstur sé varinn þar til hann er settur um borð í loftfar. Flugverndarráðstafanir samanstanda af:

— handleit sem skal vera fullnægjandi svo hægt sé að tryggja, með nokkurri vissu, að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni eða

— öðrum flugverndarráðstöfunum, sem eru hluti af verndarferli birgðakeðju, þannig að hægt sé að tryggja með nokkurri vissu að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni, sem viðurkenndir umboðsaðilar eða þekktir sendendur með ESB-fullgildingu flugverndar eða skráður sendandi, sem hann sjálfur eða viðurkenndur umboðsaðili með ESB-fullgildingu flugverndar tilnefndi, hefur beitt.

Tilvísun: liður 6.8.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

2.1. Hefur flugrekandi komið á ferli til að tryggja að flugfarmur eða flugpóstur sæti viðeigandi flugverndarráðstöfunum áður en hann er settur um borð í loftfar sem flýgur til ESB eða EES?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu	

2.2. Framkvæmir flugrekandinn eða eining fyrir hans hönd, sem fellur undir flugverndaráætlun hans, flugverndarráðstafanirnar?

Ef svarið er JÁ, skal veita nánari upplýsingar	
Ef svarið er NEI, hvaða einingar, sem ekki falla undir flugverndaráætlun flugrekanda, eru það sem viðhafa flugverndarráðstafanir vegna flugfarms eða flugpósts sem flugrekandinn flytur til ESB eða EES?	

Tilgreina skal eðli þessara eininga og veita nánari upplýsingar um þær: — einkarekið afgreiðslufyrirtæki, — ríkisrekið fyrirtæki, — ríkisrekin aðstaða eða aðili á vegum ríkisins sem annast skimun, — annað.	

2.3. Hvaða gerninga og stjórntæki (t.d. umsjón, vöktun og gæðaeftirlit) notar flugrekandinn til að sjá til þess að framangreindir þjónustuveitendur beiti flugverndarráðstöfunum á þann hátt sem krafist er?

2.4. Getur flugrekandinn farið fram á viðeigandi flugverndarráðstafanir ef einingar, sem falla ekki undir flugverndaráætlun hans, s.s. ríkisrekin aðstaða, framkvæma skimunina?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal veita nánari upplýsingar	

2.5. Hvaða gerninga og stjórntæki (t.d. umsjón, vöktun og gæðaeftirlit) notar flugrekandinn til að sjá til þess að slíkir þjónustuveitendur beiti flugverndarráðstöfunum á þann hátt sem krafist er?

2.6. Hefur verið komið á fót áætlun fyrir flugfarm og flugpóst að því er varðar viðurkennda umboðsaðila eða þekkta sendendur, í samræmi við kröfur Alþjóðaflugmálastofnunarinnar, í því ríki þar sem flugvöllurinn er staðsettur og þar sem fullgildingarheimsóknin fer fram?

Ef svarið er JÁ, skal lýsa þáttum áætlunarinnar og hvernig henni hefur verið komið á fót	

2.7. Niðurstöður og almennar athugasemdir um hvort ferlið sé áreiðanlegt, endanlegt og traust.

Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

3. HLUTI

Flugverndaráætlun flugrekanda

Markmið: ACC3-flugrekandi skal tryggja að flugverndaráætlun hans taki til allra flugverndarráðstafana sem eru viðeigandi og fullnægjandi fyrir flugfarm og flugpóst sem fluttur er til Sambandsins.

Flugverndaráætlun og tengd gögn flugrekanda skulu liggja til grundvallar flugverndarráðstöfunum sem framkvæmdar eru í samræmi við markmið þessa gátlista. Flugrekandanum er heimilt að fara fram á að koma gögnum sínum til ESB-matsmanns flugverndar áður en heimsókn hans hefst svo hann geti kynnt sér upplýsingar um starfsstöðvarnar sem hann á að heimsækja.

Tilvísun: liður 6.8.2.1 í viðaukanum og fylgiskjal 6-G við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

Athugasemd: Eftirfarandi liðir, sem taldir eru upp í fylgiskjali 6-G við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998, skulu fá viðeigandi yfirferð:

a) lýsing á ráðstöfunum sem gerðar eru varðandi flugfarm og flugpóst,

b) verklag um móttöku,

c) kerfi og viðmiðanir varðandi viðurkennda umboðsaðila,

d) kerfi og viðmiðanir varðandi þekkta sendendur,

e) kerfi og viðmiðanir varðandi skráða sendendur,

f) kröfur varðandi skimun,

g) staðsetning skimunar,

h) upplýsingar um skimunarbúnað,

i) upplýsingar um viðkomandi flugrekanda eða þjónustuveitanda,

j) skrá yfir undanþágur frá öryggisleit,

k) upplýsingar um meðhöndlun flugfarms og flugpósts sem mikil áhætta fylgir.

3.1. Flugverndaráætlun flugrekanda	
Dagsetning — nota skal nákvæmt snið fyrir dagsetningar dd/mm/áááá	
Útgáfa	
Hefur áætlunin áður verið lögð fyrir hlutaðeigandi yfirvald í ESB eða EES? Ef svarið er JÁ, var það í tengslum við ACC3-tilnefningu? Af öðrum ástæðum?	

3.2. Tekur flugverndaráætlunin nægilega vel til allra þátta skárinnar hér að framan?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra það og tilgreina ástæður	

3.3. Eru flugverndarráðstafanirnar, sem lýst er í flugverndaráætluninni, viðeigandi og fullnægjandi til að vernda flugfarm eða flugpóst sem fluttur er til ESB eða EES samkvæmt tilskildum kröfum?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra það og tilgreina ástæður	

3.4. Niðurstaða: Er flugverndaráætlunin endanleg, traust og fullgerð?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

4. HLUTI

Ráðning og þjálfun starfsfólks

Markmið: ACC3-flugrekandi skal fela ábyrgu og hæfu starfsfólki til að starfa á sviði verndunar flugfarms eða flugpósts. Starfsfólk, sem hefur aðgang að vernduðum flugfarmi, skal hafa tilskilda hæfni til að gegna skyldustörfum sínum og skal hafa fengið viðeigandi þjálfun.

Til að ná því markmiði skal ACC3-flugrekandinn hafa tiltekið verklag til að tryggja að allt starfsfólk, (t.d. fastráðið, í tímabundnu starfi, afleysingafólk, ökumenn), sem hefur beinan aðgang án fylgdar að flugfarmi eða flugpósti sem sætir eða hefur sætt flugverndarráðstöfunum:

— hafi verið látið sæta grunn- og reglubundinni athugun í aðdraganda ráðningar eða bakgrunnsskoðun, sem er a.m.k. í samræmi við kröfur staðaryfirvalda á flugvellinum sem hefur hlotið fullgildingu, og

— hafi lokið grunn- og reglubundinni verndarþjálfun til að vera meðvitað um þá ábyrgð sem það ber, með tilliti til flugverndar, í samræmi við kröfur staðaryfirvalda á þeim flugvelli sem hefur hlotið fullgildingu.

Tilvísun: liður 6.8.3.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

Athugasemd:

— Bakgrunnsskoðun felur í sér athugun á deili einstaklings og fyrri reynslu hans, þ.m.t., ef lög heimila það, á mögulegum afbrotaferli hans sem er hluti af mati á hæfi einstaklingsins til að framkvæma flugverndarráðstafanir eða að fá aðgang án fylgdar að haftasvæðum flugverndar (skilgreining í 17. viðauka Alþjóðaflugmálastofnunarinnar).

— Við athugun í aðdraganda ráðningar skal staðfesta deili á einstaklingnum á grundvelli skjalfestra sönnunargagna, fara yfir ráðningarsögu, menntun og hvers konar starfsrof næstliðin fimm ár ásamt því að fara fram á að einstaklingurinn undirriti yfirlýsingu um hugsanlegan afbrotaferil í öllum búseturíkjum a.m.k. næstliðin fimm ár (skilgreining Sambandsins).

4.1. Er verklag fyrir hendi sem tryggir að allt starfsfólk sem hefur beinan aðgang án fylgdar að vernduðum flugfarmi eða flugpósti sæti athugun í aðdraganda ráðningar þar sem lagt er mat á bakgrunn þess og hæfni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal tilgreina þann fjölda næstliðinna ára sem tekið er tillit til við athugun í aðdraganda ráðningar og tilgreina hvaða eining framkvæmir athugunina.	

4.2. Felur þetta verklag í sér?

— bakgrunnsskoðun — athugun í aðdraganda ráðningar — athugun á sakaskrá — viðtöl — annað (nánari upplýsingar). Gera skal grein fyrir framangreindum þáttum, tilgreina hvaða eining framkvæmir þennan þátt og, eftir atvikum, næstliðið tímabil sem tekið er til athugunar.	

4.3. Er verklag fyrir hendi sem tryggir að einstaklingur, sem ber ábyrgð á beitingu og umsjón með framkvæmd flugverndarráðstafana á starfsstöð, sæti athugun í aðdraganda ráðningar þar sem lagt er mat á bakgrunn hans og hæfni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal tilgreina þann fjölda næstliðinna ára sem tekið er tillit til við athugun í aðdraganda ráðningar og tilgreina hvaða eining framkvæmir athugunina.	

4.4. Felur þetta verklag í sér?

— bakgrunnsskoðun — athugun í aðdraganda ráðningar — athugun á sakaskrá — viðtöl — annað (nánari upplýsingar). Gera skal grein fyrir framangreindum þáttum, tilgreina hvaða eining framkvæmir þennan þátt og, eftir atvikum, næstliðið tímabil sem tekið er til athugunar.	

4.5. Fær starfsfólk, sem hefur beinan aðgang án fylgdar að vernduðum flugfarmi eða flugpósti, þjálfun í flugvernd áður en það fær þennan aðgang?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa inntaki og lengd þjálfunarinnar	

4.6. Fær starfsfólk, sem tekur á móti, skimar eða ver flugfarm eða flugpóst, sérstaka starfstengda þjálfun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa inntaki og lengd þjálfunarnámskeiðanna.	

4.7. Fær starfsfólkið, sem um getur í liðum 4.5 og 4.6, reglubundna þjálfun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal tilgreina þætti og tíðni reglubundnu þjálfunarinnar	

4.8. Niðurstaða: tryggja ráðstafanir, sem gerðar eru vegna ráðningar og þjálfunar starfsfólks, að öllu starfsfólki, sem hefur aðgang að vernduðum flugfarmi eða flugpósti, hafi verið úthlutað verkefnum með tilhlýðilegum hætti og að það hafi hlotið fullnægjandi þjálfun til að það geri sér grein fyrir þeirri ábyrgð sem það ber með tilliti til flugverndar?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

5. HLUTI

Verklag um móttöku

Markmið: ACC3-flugrekandi skal viðhafa tiltekið verklag að því er varðar fyrri ráðstafanir, til að leggja mat á og sannprófa verndarstöðu sendingar við móttöku. Í verklaginu skulu koma fram eftirfarandi þættir:

a) staðfesting á að einingin sem afhendir sendinguna sé skráð sem virk í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju fyrir tilgreinda flugvöllinn eða starfsstöðina,

b) sannprófun á að einstakt alstafakennimerki einingarinnar, sem afhendir sendinguna, sé tilgreint í meðfylgjandi gögnum,

c) sannprófun á að einingin sé skráð í gagnagrunn flugrekandans ef um er að ræða sendingar frá skráðum sendanda.

Ef kennimerkið kemur ekki fram í meðfylgjandi gögnum eða ef sá flugrekandi eða sú eining sem afhendir sendingarnar er ekki skráð „virk“ í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju eða, ef einingin, sem afhendir sendingarnar, er skráður sendandi sem ekki er skráður í gagnagrunn flugrekandans, skal það metið svo að flugverndarráðstafanir hafi ekki verið framkvæmdar og sendingarnar skulu skimaðar af ACC3-flugrekanda eða af öðrum RA3-umboðsaðila sem hefur fengið ESB-fullgildingu flugverndar, áður en þær eru settar um borð í loftfarið,

d) sannprófun á því hvort sendingin hafi borist frá einstaklingi, sem viðurkenndur umboðsaðili eða þekktur sendandi með ESB-fullgildingu flugverndar, eins og skráð er í gagnagrunni hans, hefur tilnefnt eða frá skráðum sendanda þessa viðurkennda umboðsaðila eða sem var tilnefndur af flugrekandanum sjálfum,

e) tilnefndur einstaklingur skal vera sá sem falið er að afhenda flugrekandanum flugfarm eða flugpóst; sá sem afhendir flugrekandanum sendinguna skal framvísa kennivottorði, vegabréfi, ökuskírteini eða öðru skjali með ljósmynd, sem landsyfirvald hefur gefið út eða sem það viðurkennir,

f) eftir atvikum, sannprófun á því hvort sendingunni fylgi allar tilskildar verndarupplýsingar (flugfarmbréf og upplýsingar um verndarstöðu á pappír eða með rafrænum hætti, lýsing á sendingunni og einstakt kennimerki hennar, ástæðurnar fyrir útgáfu stöðu flugverndar, úrræði eða aðferðir sem voru notaðar við skimun eða ástæður þess að sendingunni var veitt undanþága frá skimun) sem samsvara þeim flugfarmi og póstsendingum sem afhent eru,

g) sannprófun á því hvort sendingin beri nokkur merki þess að vernd hennar hafi verið rofin og

h) sannprófun á því hvort meðhöndla beri sendinguna sem farm og póst sem mikil áhætta fylgir.

Tilvísun: liðir 6.8.3.5, 6.8.3.6, 6.8.3.7, og 6.8.5.4 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

5.1. Þegar flugrekandi tekur á móti sendingu með beinum hætti, gengur hann þá úr skugga um hvort hún komi frá viðurkenndum umboðsaðila, þekktum sendanda eða skráðum sendanda sem hefur fengið viðurkenningu samkvæmt löggjöf um flugfarm í Sambandinu og er skráður í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju og í gagnagrunn flugrekandans?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa verklaginu	
5.2. Sannprófar flugrekandinn tilgreiningu einstaka alstafamerkisins í gögnunum sem fylgja sendingum frá öðrum ACC3-flugrekanda, RA3-umboðsaðila eða KC3-sendanda og staðfestir hún virka ACC3-, RA3- eða KC3-stöðu hans í gagnagrunninum um verndaða aðfangakeðju?	
JÁ eða NEI	
5.3. Hefur einingin fyrir hendi verklag til að tryggja að ef gögnin innihalda ekki einstaka alstafamerkið eða ef einingin, sem sendingin kom frá, hefur ekki virka stöðu í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju, sé sendingin meðhöndluð sem sending með óþekktan uppruna?	
JÁ eða NEI	
5.4. Tilnefnir flugrekandinn sendendur sem AC3-sendendur?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa verklaginu og verndarráðstöfunum sem flugrekandinn krefst af sendandanum.	
5.5. Þegar flugrekandi tekur á móti sendingu með beinum hætti, gengur hann þá úr skugga um hvort ákvörðunarstaður hennar sé flugvöllur í ESB eða EES?	
JÁ eða NEI — nánari útskýring	
5.6. Ef svarið er JÁ — lætur flugrekandinn þá allan farm eða póst sæta sömu flugverndarráðstöfunum þegar ákvörðunarstaðurinn er á flugvelli í ESB eða EES?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa verklaginu	

5.7. Þegar flugrekandi tekur á móti sendingu með beinum hætti, gengur hann þá úr skugga um hvort meðhöndla beri sendinguna sem farm eða póst sem mikil áhætta fylgir, þ.m.t. sendingar sem flytja á með öðrum hætti en með flugi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig er því háttað? Lýsa skal verklaginu	

5.8. Þegar flugrekandi tekur á móti verndaðri sendingu, gengur hann þá úr skugga um hvort hún hafi verið varin gegn óheimilum aðgangi og/eða hvort vernd hennar hafi verið rofin?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því nánar (t.d. innsigli, lásar).	

5.9. Þegar flugrekandi tekur á móti flugfarmi eða flugpósti vegna gegnumferðar á þessum stað (farmur eða póstur sem fer með sama loftfari og hann kom með), gengur hann þá úr skugga um, á grundvelli uppgefinna gagna, hvort beita þurfi frekari flugverndarráðstöfunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig gengur hann úr skugga um það?	
Ef svarið er NEI, hvaða flugverndarráðstöfunum er beitt til að vernda farm og póst sem er fluttur til ESB eða EES?	

5.10. Þegar flugrekandi tekur á móti flugfarmi eða flugpósti vegna flugskipta á þessum stað (farmur eða póstur sem fer með öðru loftfari en hann kom með), gengur hann þá úr skugga, á grundvelli uppgefinna gagna, hvort beita þurfi frekari flugverndarráðstöfunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig gengur hann úr skugga um það?	
Ef svarið er NEI, hvaða flugverndarráðstöfunum er beitt til að vernda farm og póst sem er fluttur til ESB eða EES?	

5.11. Er þess krafist að einstaklingurinn, sem afhendir flugrekandanum verndaðan, þekktan flugfarm, leggi fram opinbert auðkennisskírteini með mynd?

JÁ eða NEI	

5.12. Niðurstaða: Er verklag, sem er fyrir hendi um móttöku, fullnægjandi til að ganga úr skugga um hvort flugfarmur eða flugpóstur komi frá verndaðri birgðakeðju eða hvort þörf sé á að skima hann?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

6. HLUTI

Gagnagrunnur

Markmið: Ef ACC3-flugrekanda er ekki gert skylt að skima 100% flugfarm eða flugpóst, sem fluttur er til ESB/EES, skal hann tryggja að farmurinn eða pósturinn komi frá einingu með ESB-fullgildingu flugverndar sem hefur fengið tilnefningu frá hlutaðeigandi yfirvaldi aðildarríkis ESB sem viðurkenndur umboðsaðili í þriðja landi (RA3-umboðsaðili) eða þekktur sendandi í þriðja landi (KC3-sendandi), eða frá skráðum sendanda (AC3-sendanda) sem hann sjálfur eða viðurkenndur umboðsaðili í þriðja landi tilnefndi.

Í því skyni að vakta skoðunarskrár er varðar viðkomandi vernd skal ACC3-flugrekandinn sannprófa að RA3-umboðsaðilinn og KC3-sendandinn hafi virka stöðu í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju og halda gagnagrunn þar sem veittar eru eftirfarandi upplýsingar um hverja einingu eða einstakling, sem flugrekandinn tekur við farmi eða pósti frá með beinum hætti:

— staða einingarinnar sem um er að ræða (viðurkenndur umboðsaðili eða þekktur sendandi),

— upplýsingar um fyrirtækið, þ.m.t. áreiðanlegt heimilisfang fyrirtækisins,

— hvers eðlis fyrirtækið er, að undanskildum viðkvæmum viðskiptaupplýsingum,

— tengiliðaupplýsingar, þ.m.t. tengiliðaupplýsingar um einstakling eða einstaklinga sem bera ábyrgð á flugvernd,

— hið einstaka alstafakennimerki í gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju eða, ef einingin er AC3-sendandi, skráningarnúmer fyrirtækisins.

Þegar ACC3-flugrekandi tekur á móti flugfarmi eða flugpósti frá RA3-umboðsaðila eða KC3-sendanda skal hann athuga hvort einingin sé skráð sem virk í gagnagrunni Sambandsins og, ef um AC3-sendanda er að ræða, í gagnagrunni flugrekandans. Ef staða RA3-umboðsaðilans eða KC3-sendandans er ekki virk eða AC3-sendandinn er ekki skráður í gagnagrunninum skal skima flugfarminn eða flugpóstinn, sem einingin afhenti, áður en hann er settur um borð í loftfar.

Tilvísun: a-liður liðar 6.8.3.5 og liður 6.8.5.4 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998

6.1. Þegar flugrekandi tekur á móti sendingu með beinum hætti, gengur hann þá úr skugga um hvort hún komi frá viðurkenndum umboðsaðila, þekktum sendanda eða skráðum sendanda sem hefur fengið viðurkenningu samkvæmt löggjöf um flugfarm í Sambandinu og er skráður í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju og í gagnagrunn flugrekandans?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa verklaginu	

6.2. Heldur flugrekandinn gagnagrunn þar sem er að finna, eins og við á, upplýsingarnar sem um getur að framan, um:

— einingar sem eru tilnefndar sem viðurkenndir umboðsaðilar í þriðja landi (RA3-umboðsaðilar),

— einingar sem eru tilnefndar sem þekktir sendendur í þriðja landi (KC3-sendendur),

— einingar sem RA3-umboðsaðili eða flugrekandinn hefur tilnefnt sem skráða sendendur (AC3-sendendur)?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa gagnagrunninum.	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju svo er ekki	

6.3. Hefur starfsfólk, sem tekur á móti flugfarmi og flugpósti, greiðan aðgang að gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju og að gagnagrunni flugrekandans?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu	

6.4. Er gagnagrunnurinn uppfærður reglulega til að veita starfsfólki, sem tekur á móti flugfarmi og flugpósti, áreiðanleg gögn?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju svo er ekki	

6.5. Niðurstaða: Heldur flugrekandi gagnagrunn sem tryggir fullt gagnsæi um tengsl hans við einingar, sem hann tekur beint við farmi eða pósti frá (sem búið er að skima eða sem hefur sætt flugverndarráðstöfunum) til flutnings inn í Sambandið eða EES?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

7. HLUTI

Skimun

Markmið: Ef ACC3-flugrekandi tekur við farmi og pósti frá einingu, sem ekki hefur ESB-fullgildingu flugverndar, eða farmurinn, sem tekið er við, hefur ekki verið varinn gegn óheimilum aðgangi frá því að flugvarnarráðstöfunum var beitt skal ACC3-flugrekandi tryggja að farmurinn sé skimaður áður en hann er settur um borð í loftfar. ACC3-flugrekandinn skal koma á ferli til að tryggja að farmur og póstur sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, vegna flugskipta, gegnumferðar eða affermingar á flugvelli í Sambandinu, sé skimaður með því að nota úrræðin eða aðferðirnar, sem um getur í löggjöf Sambandsins, þannig að tryggt sé, með nokkurri vissu, að hann innihaldi enga bannaða hluti.

Ef ACC3-flugrekandi skimar ekki sjálfur flugfarm eða flugpóst skal hann tryggja að viðeigandi skimun eigi sér stað samkvæmt kröfum Sambandsins. Verklag um skimun skal, eftir því sem við á, taka til meðhöndlunar á farmi og pósti í flugskiptum og gegnumferð.

Ef hlutaðeigandi yfirvald í þriðja landi eða einhver fyrir þess hönd framkvæmir skimun á flugfarmi eða flugpósti skal ACC3-flugrekandinn, sem tekur á móti slíkum flugfarmi eða flugpósti frá einingu, lýsa því í flugverndaráætlun sinni og tilgreina með hvaða hætti fullnægjandi skimun er tryggð.

Tilvísun: liðir 6.8.3.1, 6.8.3.2, og 6.8.3.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

7.1. Framkvæmir flugrekandinn, eða eining fyrir hans hönd, skimun sem fellur undir flugverndaráætlun hans?

Ef svarið er JÁ skal veita nánari upplýsingar. Ef við á, skal veita nánari upplýsingar um einingu eða einingar sem falla undir flugverndaráætlun flugrekandans: — Heiti — heimilisfang tiltekinnar starfsstöðvar — staða hans sem viðurkenndur rekstraraðili, ef við á	

Ef svarið er NEI, hvaða einingar, sem falla ekki undir flugverndaráætlun flugrekanda, eru það sem skima flugfarm eða flugpóst sem flugrekandinn flytur til ESB eða EES? Tilgreina skal eðli þessara eininga og veita nánari upplýsingar um þær — einkarekið afgreiðslufyrirtæki — ríkisrekið fyrirtæki — ríkisrekin aðstaða eða aðili á vegum ríkisins sem annast skimun — annað.	

7.2. Getur einingin óskað eftir viðeigandi flugverndarráðstöfunum ef skimun er framkvæmd af einni af framangreindum einingum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal veita nánari upplýsingar	

7.3. Hvaða gerninga og stjórntæki (t.d. umsjón, vöktun og gæðaeftirlit) notar einingin til að sjá til þess að slíkir þjónustuveitendur beiti flugverndarráðstöfunum á þann hátt sem krafist er?

7.4. Hvaða aðferðir eru notaðar við að skima flugfarm og flugpóst?

Tilgreina skal aðferðirnar, þ.m.t. upplýsingar um búnað sem notaður er til að skima flugfarm og flugpóst (t.d. framleiðanda, tegund, útgáfu hugbúnaðar, staðla, raðnúmer) fyrir allar aðferðirnar sem notaðar eru.	

7.5. Er búnaðurinn eða aðferðin, (t.d. sprengjuleitarhundar) sem notuð er, í nýjustu skrá yfir búnað og aðferðir sem uppfylla kröfur ESB, Evrópusambands flugmálastjórna (ECAC) eða Öryggisstjórnar samgöngumála í Bandaríkjunum (TSA)?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal veita nánari upplýsingar	
Ef svarið er NEI, skal veita nánari upplýsingar, tilgreina samþykki fyrir búnaði og dagsetningu þess sem og allt sem bendir til þess að búnaðurinn uppfylli kröfur ESB um búnað.	

7.6. Er búnaðurinn notaður í samræmi við notkunarleiðbeiningar (e. *concept of operation* – CONOPS) framleiðanda og er hann prófaður reglulega og haldið við?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu	

7.7. Ef sprengjuleitahundar eru notaðir, gangast þeir þá undir ferli grunnþjálfunar og reglubundinnar þjálfunar, viðurkenningu og gæðaeftirlit samkvæmt staðli sem samsvarar kröfum ESB eða Öryggisstjórnar samgöngumála í Bandaríkjunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa öllu ferlinu og tilheyrandi gögnum sem styðja matið.	

7.8. Ef sprengjuleitahundar eru notaðir fylgir skimunarferlið þá innsetningaraðferð sem jafngildir kröfum ESB eða Öryggisstjórnar samgöngumála í Bandaríkjunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa öllu ferlinu og tilheyrandi gögnum sem styðja matið.	

7.9. Er tekið tillit til þess hvers eðlis sendingin er við skimun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa hvernig tryggt sé að aðferðin, sem valin er til skimunar, sé fullnægjandi til að tryggja, með nokkurri vissu, að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni.	

7.10. Er ferli í notkun sem fylgja á ef skimunarbúnaður gefur frá sér viðvörun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu, sem fylgja á þegar viðvörun er gefin, til að tryggja, með nokkurri vissu, að um enga bannaða hluti sé að ræða.	
Ef svarið er NEI, skal útskýra hvað verður um sendinguna.	

7.11. Eru einhverjar sendingar undanþegnar öryggisleit?

JÁ eða NEI	

7.12. Eru einhverjar undanþágur sem samrýmast ekki skrá Sambandsins?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal gefa nánari upplýsingar	

7.13. Er aðgangi að skimunarsvæði stýrt til að tryggja að einungis starfsfólk, sem hefur heimild og hefur hlotið þjálfun, hafi aðgang að því?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

7.14. Er viðhöfð virk gæðastjórnun eða prófunarfyrirkomulag?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

7.15. Niðurstaða: Er allur flugfarmur eða flugpóstur skimaður með einu af þeim úrræðum eða aðferðum sem taldar eru upp í lið 6.2.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998, þannig að tryggt sé, með nokkurri vissu, að ekki sé um að ræða neina bannaða hluti?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

8. HLUTI

Farmur eða póstur sem mikil áhætta fylgir

Markmið: Ef sendingar koma upphaflega frá tilteknum stöðum eða hafa flugskipti á tilteknum stöðum, sem eru skilgreindir þannig að mikil áhætta fylgi þeim samkvæmt ESB, eða svo virðist sem vernd sendinganna hafi verið verulega rofin, ber að meðhöndla þær sem farm eða póst sem mikil áhætta fylgir. Slíkar sendingar þarf að skima í samræmi við sérstök fyrirmæli. Viðeigandi yfirvald ESB/EES, sem hefur tilnefnt ACC3-flugrekandann, skal veita upplýsingar um hvaða upprunastöðum fylgir mikil áhætta og gefa fyrirmæli um skimun. ACC3-flugrekandinn skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES og mikil áhætta fylgir, sé auðgreindur sem og að hann sæti viðeigandi flugverndarráðstöfunum eins og skilgreint er í löggjöf Sambandsins.

ACC3-flugrekandinn skal vera í sambandi við hlutaðeigandi yfirvald, sem er ábyrgt fyrir flugvöllum í ESB/EES sem flugrekandinn flytur farm til, þannig að hann hafi nýjustu upplýsingar um upprunastaði sem mikil áhætta fylgir.

ACC3-flugrekandinn skal gera sömu ráðstafanir, hvort sem hann tekur við farmi og pósti, sem mikil áhætta fylgir, frá öðrum flugrekanda eða með öðrum flutningsmáta.

Tilvísun: liðir 6.7 og 6.8.3.6 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

Athugasemd: Farmur eða póstur, sem mikil áhætta fylgir, og heimild hefur verið gefin að fluttur verði til ESB eða EES, skal fá útgefna stöðu flugverndar „SHR“, sem þýðir að sendingin telst örugg til flutnings með farþega-, farm- og póstloftfari í samræmi við kröfur um sendingar sem mikil áhætta fylgir.

8.1. Veit starfsfólk flugrekanda, sem ber ábyrgð á flugverndarráðstöfunum, hvaða flugfarm og flugpóst ber að meðhöndla sem farm og póst sem mikil áhætta fylgir?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

8.2. Er verklag fyrir hendi hjá flugrekandanum um hvernig skuli auðgreina farm og póst sem mikil áhætta fylgir?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

8.3. Fellur farmur og póstur, sem mikil áhætta fylgir, undir verklag um skimun samkvæmt löggjöf ESB?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina hvaða verklagi skuli beitt	

8.4. Gefur flugrekandi, að skimun lokinni, út yfirlýsingu um stöðu flugverndar „SHR“ í gögnum sem fylgja sendingunni?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því hvernig staða flugverndar er gefin út og í hvaða skjali	

8.5. Niðurstaða: Er ferlið, sem flugrekandi hefur komið á, viðeigandi og fullnægjandi til að tryggja að allur farmur og póstur, sem mikil áhætta fylgir, hafi hlotið viðeigandi meðhöndlun áður en hann er settur um borð í loftfar?	
JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

9. HLUTI

Vörn

Markmið: ACC3-flugrekandi skal koma á ferli til að tryggja að flugfarmur eða flugpóstur, sem fluttur er til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi frá því að öryggisleit eða aðrar flugverndarráðstafanir eru gerðar eða frá því að tekið er við honum eftir að hann hefur farið í gegnum skimun eða sætt flugverndarráðstöfunum og þar til hann er settur um borð í loftfar.

Veita má vörn með því að nota mismunandi úrræði, s.s. efnisleg úrræði (t.d. fyrirstöður, læst herbergi), mannleg úrræði (t.d. eftirlitsferðir, þjálfað starfsfólk) og tæknileg úrræði (t.d. eftirlitsmyndavélar (CCTV), innbrotsviðvörunarkerfi).

Verndaður farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, skal vera aðskilinn frá öðrum flugfarmi eða flugpósti sem ekki er verndaður.

Tilvísun: liður 6.8.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

9.1. Gerir flugrekandi, eða eining fyrir hans hönd sem fellur undir flugverndaráætlun hans, ráðstafanir til að verja verndaðan flugfarm og flugpóst?	
Ef svarið er JÁ, skal veita nánari upplýsingar	
Ef svarið er NEI, hvaða einingar, sem falla ekki undir flugverndaráætlun flugrekanda, eru það sem gera ráðstafanir til að verja verndaðan flugfarm og flugpóst sem flugrekandinn flytur til ESB eða EES? Tilgreina skal eðli þessara eininga og veita nánari upplýsingar um þær: — einkarekið afgreiðslufyrirtæki — ríkisrekið fyrirtæki — ríkisrekin aðstaða eða aðili á vegum ríkisins sem annast skimun — annað.	

9.2. Eru viðhafðar flugverndarráðstafanir og vörn til að koma í veg fyrir að vernd flugfarmsins eða flugpóstsins verði rofin meðan á skimun stendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

9.3. Er ferli fyrir hendi sem tryggir að flugfarmur eða flugpóstur, sem fluttur er til ESB eða EES og fellur undir flugverndarráðstafanir, sé varinn gegn óheimilum aðgangi frá því að hann hefur hlotið verndun og þar til hann er settur um borð í loftfar?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því hvernig hann er varinn.	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	

9.4. Niðurstöður: Eru ráðstafanir, sem gerðar eru til að verja sendingar, nægilega traustar til að koma í veg fyrir ólöglegt athæfi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu.	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

10. HLUTI

Meðfylgjandi gögn

Markmið: ACC3-flugrekandinn skal sjá til þess að í gögnunum, sem fylgja sendingu sem hann hefur viðhaft flugverndarráðstafanir gagnvart (t.d. skimun, vernd), komi a.m.k. fram:

a) einstaka alstafakennimerkið, sem hlutaðeigandi yfirvald sem veitir tilnefningu, úthlutaði og

b) einstakt kennimerki sendingarinnar, s.s. númer á (grunn- eða aðal-) flugfarmbréfi, þegar við á, og

c) innihald sendingarinnar og d) verndarstaðan, sem er tilgreind eins og hér greinir:

— „SPX“: sending telst örugg til flutnings með farþega-, farm- og póstloftfari eða

— „SCO“: sending telst einungis örugg til flutnings með farm- og póstloftfari eða

— „SHR“: sending telst örugg til flutnings með farþega-, farm- og póstloftfari í samræmi við kröfur um mikla áhættu.

Ef viðurkenndum umboðsaðila í þriðja landi er ekki til að dreifa hefur ACC3-flugrekandi eða flugrekandi, sem kemur frá þriðja landi og er undanþeginn ACC3-fyrirkomulaginu, heimild til að gefa út yfirlýsingu um stöðu flugverndar.

Ef ACC3-flugrekandinn gefur út flugverndarstöðuna skal flugrekandinn, þar að auki, tilgreina ástæðurnar fyrir útgáfu hennar, s.s. úrræði eða aðferð sem var notuð við skimun, eða ástæðu þess að sendingunni var veitt undanþága frá skimun, með því að nota staðlana sem voru samþykktir í áætluninni um yfirlýsingu um flugvernd sendinga.

Ef flugverndarstaðan og fylgigögnin voru útbúin af RA3-umboðsaðila fyrr í ferlinu eða af öðrum ACC3-flugrekanda skal ACC3-flugrekandinn sannprófa, í viðtökuferlinu, að framangreindar upplýsingar sé að finna í fylgigögnunum.

Gögnin sem fylgja sendingunni geta annaðhvort verið flugfarmbréf, sambærileg póstskjöl eða sérstök yfirlýsing, og annaðhvort verið á rafrænu eða skriflegu formi.

Tilvísun: d-liður liðar 6.3.2.6, liðir 6.8.3.4, 6.8.3.5. 6.8.3.6 og 6.8.3.7 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

10.1. Sér flugrekandinn til þess að viðeigandi fylgigögn séu útbúin og að þau innihaldi upplýsingarnar sem krafist er í d-lið liðar 6.3.2.6, liðum 6.8.3.4, 6.8.3.5 og 6.8.3.6 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa innihaldi skjalanna.	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju og hvernig flugrekandi meðhöndlar farm eða póst sem „verndaðan“ ef hann er settur um borð í loftfar.	

10.2. Er einstakt alstafakennimerki ACC3-flugrekandans að finna í gögnunum?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju svo er ekki	

10.3. Er verndarstaða farmsins tilgreind í gögnunum og hvernig þeirri stöðu var náð?

JÁ eða NEI	
Lýsa skal hvernig þetta er tilgreint	

10.4. Niðurstaða: Er gagnaferlið fullnægjandi til að tryggja að farmi eða pósti fylgi viðeigandi gögn þar sem tilgreind er rétt verndarstaða og allar upplýsingar sem krafist er?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu.	
Athugasemdir frá flugrekanda	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

11. HLUTI

Reglufylgni

Markmið: Eftir að hafa lagt mat á framangreinda tíu hluta þessa gátlista skal ESB-matsmaður flugverndar komast að niðurstöðu um það hvort sannprófun á starfsstöð samsvari innihaldi þess hluta flugverndaráætlunar flugrekanda þar sem lýst er ráðstöfunum, sem gripið er til í tengslum við flugfarm eða flugpóst sem fluttur er til ESB eða EES, og hvort flugverndarráðstafanirnar uppfylli markmið þessa gátlista með fullnægjandi hætti.

Niðurstöðurnar gætu samanstaðið af einu af eftirfarandi mögulegum megintilvikum:

1) flugverndaráætlun flugrekanda samrýmist fylgiskjali 6-G við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 og með sannprófun á starfsstöð er staðfest að farið sé að markmiðum þessa gátlista eða

2) flugverndaráætlun flugrekanda samrýmist fylgiskjali 6-G við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 en sannprófun á starfsstöð staðfestir ekki að farið sé að markmiðum þessa gátlista eða

3) flugverndaráætlun flugrekanda samrýmist ekki fylgiskjali 6-G við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 en sannprófun á starfsstöð staðfestir að farið sé að markmiðum þessa gátlista eða

4) flugverndaráætlun flugrekanda samrýmist ekki fylgiskjali 6-G við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 og sannprófun á starfsstöð staðfestir ekki að farið sé að markmiðum þessa gátlista.

11.1. Almennar niðurstöður: Tilgreina skal tilvikið sem best samsvarar aðstæðunum sem hafa fengið fullgildingu	
1, 2, 3 eða 4	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	
Athugasemdir frá flugrekanda	

Nafn matsmanns:

Dagsetning:

Undirskrift:

VIÐAUKI

Skrá yfir einstaklinga og einingar sem hafa verið heimsótt og viðtöl tekin við

Tilgreina skal heiti einingar, nafn og stöðu tengiliðar og hvenær heimsókn eða viðtal fór fram.

Heiti einingar	Nafn tengiliðar	Staða tengiliðar	Dagsetning heimsóknar eða viðtals

FYLGISKJAL 6-C4

GÁTLISTI FYRIR ÞEKKTA SENDENDUR Í ÞRIÐJA LANDI MEÐ ESB-FULLGILDINGU FLUGVERNDAR

Einingar í þriðja landi eiga kost á að verða hluti af verndaðri birgðakeðju ACC3-flugrekanda (flugrekandi sem flytur flugfarm eða flugpóst inn í Evrópusambandið frá flugvelli í þriðja landi) með því að óska eftir tilnefningu sem þekktur sendandi í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar (KC3-sendandi). KC3-sendandi er eining sem annast afgreiðslu farms í þriðja landi, hefur fengið fullgildingu og verið samþykkt sem slík á grundvelli ESB-fullgildingar flugverndar.

KC3-sendandi skal tryggja að viðhafðar séu flugverndarráðstafanir vegna allra sendinga til Sambandsins ([1]) og að sendingarnar séu varðar gegn óheimilum aðgangi frá því að flugverndarráðstafanirnar voru gerðar og þar til þær hafa verið afhentar ACC3-flugrekanda eða viðurkenndum umboðsaðila í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar (RA3-umboðsaðili).

Í framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998 er mælt fyrir um forsendur fyrir því að geta flutt farm eða póst með flugi til Evrópusambandsins (ESB) eða Íslands, Noregs og Sviss.

Gátlistinn er stjórntæki sem ESB-matsmaður flugverndar á að nota til að meta verndarstigið fyrir flugfarm eða flugpóst ([2]), sem einingin, sem sækir um tilnefningu sem KC3-sendandi, flytur með flugi til ESB eða EES eða er ábyrg fyrir flutningnum. Gátlistann á aðeins að nota í tilvikunum sem eru tilgreind í b-lið liðar 6.8.5.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998. Í tilvikunum, sem tilgreind eru í a-lið liðar 6.8.5.1 í fyrrnefndum viðauka, skal ESB-matsmaður flugverndar nota ACC3-gátlistann.

Fullgildingarskýrsluna skal afhenda hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, og einingunni, sem hefur fengið fullgildingu, innan eins mánaðar hið lengsta eftir að sannprófun á starfsstöð hefur farið fram. Óaðskiljanlegir hlutar fullgildingarskýrslu skulu a.m.k. vera eftirfarandi:

— fullgerður gátlisti, undirritaður af ESB-matsmanni flugverndar og, eftir atvikum, með athugasemdum frá einingunni sem hefur fengið fullgildingu og

([1]) Aðildarríki Evrópusambandsins: Austurríki, Belgía, Búlgaría, Króatía, Kýpur, Tékkland, Danmörk, Eistland, Finnland, Frakkland, Þýskaland, Grikkland, Ungverjaland, Írland, Ítalía, Lettland, Litháen, Lúxemborg, Malta, Holland, Pólland, Portúgal, Rúmenía, Slóvakía, Slóvenía, Spánn, Svíþjóð og Bretland.

([2]) Þegar þessi gátlisti um fullgildingu varðar flugfarm eða flugpóst eða loftfar þar sem ákvörðunarstaðurinn er ESB eða EES, varðar hann að sama skapi flugfarm eða flugpóst eða loftfar þar sem ákvörðunarstaðurinn er ESB sem og Ísland, Noregi og Sviss.

— yfirlýsing um skuldbindingar (fylgiskjal 6-H3 við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998), undirrituð af einingunni sem hefur fengið fullgildingu og

— yfirlýsing um sjálfstæði (fylgiskjal 11-A við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998), að því er varðar einingunа, sem hefur fengið fullgildingu, sem ESB-matsmaður flugverndar hefur undirritað.

Númeraröð blaðsíðna, dagsetning ESB-fullgildingar flugverndar og merking hverrar blaðsíðu með upphafsstöfum matsmanns og einingarinnar, sem hefur fengið fullgildingu, skulu sýna fram á heildarsamfellu fullgildingarskýrslunnar.

KC3-sendandinn skal geta notað skýrsluna í viðskiptatengslum sínum við alla ACC3-flugrekendur og alla RA3-umboðsaðila.

Fullgildingarskýrslan skal ávallt vera á ensku.

Að því er varðar þá hluta sem ekki er hægt að meta samkvæmt kröfunum í framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998, fela grunnkröfur í sér kröfur og ráðlagðar starfsvenjur í 17. viðauka við Chicago-samninginn um alþjóðlegt almenningsflug og leiðbeiningar sem finna má í handbók Alþjóðaflugmálastofnunarinnar um flugvernd (skjal nr. 8973-takmörkuð dreifing).

Athugasemdir til útskýringar:

1) Fylla verður út alla gildandi og viðeigandi hluta gátlistans í samræmi við viðskiptalíkan og starfsemi einingarinnar sem á að fullgilda. Ef engar upplýsingar eru fáanlegar verður að gera grein fyrir því.

2) Að loknum hverjum hluta skal ESB-matsmaður flugverndar komast að niðurstöðu um það hvort og að hve miklu leyti markmið þessa hluta hafi náðst.

1. HLUTI

Rekstraraðili og ábyrgð

1.1. Dagsetning eða dagsetningar fullgildingar	
Nota skal nákvæmt snið fyrir dagsetningar, s.s. frá 01.10.2012 til 02.10.2012	
dd/mm/áááá	

1.2. Dagsetning fyrri fullgildingar, ef við á.	
dd/mm/áááá	
Fyrra KC3-skráningarnúmer, ef það liggur fyrir.	
Skírteini fyrir viðurkenndan rekstraraðila (AEO) eða C-TPAT-staða eða hugsanleg útgáfa annarra skírteina	

1.3. Upplýsingar um matsmann flugverndar	
Nafn	
Fyrirtæki/stofnun/yfirvald	
Einstakt alstafakennimerki (UAI)	
Tölvupóstfang	
Símanúmer — þ.m.t. alþjóðakóðar	

1.4. Heiti einingar

Heiti	
Númer fyrirtækis (t.d. kenninúmer í fyrirtækjaskrá, ef við á)	
Númer/Deild/Bygging	
Gata	
Bæjarfélag	
Póstnúmer	
Ríki (ef við á)	
Land	
P.O. Heimilisfang pósthólfs, ef við á	

1.5. Aðalheimilisfang stofnunar (ef það er annað en starfsstöðvarinnar sem á að fullgilda)

Númer/Deild/Bygging	
Gata	
Bæjar félag	
Póstnúmer	
Ríki (ef við á)	
Land	
P.O. Heimilisfang pósthólfs, ef við á	

1.6. Eðli viðskipta – tegund farms sem er meðhöndlaður

Hvert er eðli viðskiptanna – hverrar tegundar er farmurinn sem er meðhöndlaður á athafnasvæði umsækjanda?	

1.7. Ber umsækjandi ábyrgð á...?

a) framleiðslu b) pökkun c) geymslu d) sendingu e) öðru (tilgreina skal hvað).	

1.8. Áætlaður fjöldi starfsmanna á starfsstöð

Fjöldi	

1.9. Nafn og titill einstaklings sem ber ábyrgð á vernd flugfarms eða flugpósts frá þriðja landi

Nafn	
Starfsheiti	
Tölvupóstfang	
Símanúmer — þ.m.t. alþjóðakóðar	

2. HLUTI

Skipulag og ábyrgð þekkts sendanda í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar

Markmið: Hvorki skal flytja farm né póst með flugi til ESB eða EES án þess að hann sæti flugverndarráðstöfunum. Aðeins má samþykkja farm og póst, sem KC3-sendandi afhendir ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila, sem verndaðan farm eða póst ef KC3-sendandinn hefur framkvæmt slíkar flugverndarráðstafanir. Nánari upplýsingar um slíkar ráðstafanir er að finna í eftirfarandi hlutum þessa gátlista.

KC3-sendandinn skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að viðeigandi flugverndarráðstöfunum sé beitt vegna alls farms eða pósts, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, og að verndaður farmur eða póstur sé varinn þar til hann er afhentur ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila. Flugverndarráðstafanirnar tryggja, með nokkurri vissu, að engir bannaðir hlutir séu faldir í sendingunni.

Tilvísun: liður 6.8.3 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

2.1. Hefur einingin komið á fót flugverndaráætlun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal fara beint í lið 2.5	

2.2. Upplýsingar um flugverndaráætlun einingar

Dagsetning – nota skal nákvæmt snið fyrir dagsetningar dd/mm/áááá	
Útgáfa	
Hefur flugverndaráætlun verið lögð fyrir eða samþykkt af hlutaðeigandi yfirvaldi í ríkinu þar sem einingin er staðsett? Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu.	

2.3. Tekur flugverndaráætlunin nægilega vel til þáttanna sem taldir eru upp í 4.–11. hluta gátlistans?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra það og tilgreina ástæðurnar	

2.4. Er flugverndaráætlunin endanleg, traust og fullgerð?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður	

2.5. Hefur einingin komið á ferli til að tryggja að farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, sæti viðeigandi flugverndarráðstöfunum áður en hann er afhentur ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa ferlinu	

2.6. Er stjórnunarkerfi hjá einingunni (t.d. stjórntæki, leiðbeiningar) til að tryggja að flugverndarráðstafanir, sem krafist er, séu framkvæmdar?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa stjórnunarkerfinu og skýra hvort hlutaðeigandi yfirvald eða önnur eining hafi samþykkt það, skoðað eða látið það í té.	
Ef svarið er NEI, skal útskýra hvernig einingin tryggir að flugverndarráðstafanir séu framkvæmdar á tilskilinn hátt.	

2.7. Niðurstöður og almennar athugasemdir um hvort ferlið sé áreiðanlegt, endanlegt og traust.

Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

3. HLUTI

Auðgreinanlegur flugfarmur eða flugpóstur

Markmið: Að staðfesta hvenær eða hvar farmur eða póstur verður auðgreinanlegur sem flugfarmur eða flugpóstur.

3.1. Staðfesta skal með skoðun á sviði framleiðslu, pökkunar, geymslu, vals, sendingar og á hvers konar öðrum sviðum sem máli skipta, hvar og hvernig farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, verður auðgreinanlegur sem slíkur.

Lýsa skal nánar	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

Í 6.–9. hluta ætti að gefa ítarlegar upplýsingar um vörn auðgreinanlegs flugfarms eða flugpósts gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin.

4. HLUTI

Ráðning og þjálfun starfsfólks

Markmið: Til að tryggja að tilskildum flugverndarráðstöfunum sé beitt skal RA3-umboðsaðilinn fela ábyrgu og hæfu starfsfólki að starfa á sviði verndunar flugfarms eða flugpósts. Starfsfólk, sem hefur aðgang að auðgreinanlegum flugfarmi, skal hafa tilskilda hæfni til að gegna skyldustörfum sínum og skal hafa fengið viðeigandi þjálfun.

Til að ná því markmiði skal KC3-sendandinn hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að allt starfsfólk (t.d. fastráðið, í tímabundnu starfi, afleysingafólk, bílstjórar), sem hefur beinan aðgang án fylgdar að flugfarmi eða flugpósti sem sætir eða hefur sætt flugverndarráðstöfunum:

a) hafi verið látið sæta grunn- og reglubundnu eftirliti í aðdraganda ráðningar eða bakgrunnsskoðun, sem er a.m.k. í samræmi við kröfur, sem staðaryfirvöld gera til athafnasvæðis KC3-sendandans sem hefur fengið fullgildingu, og

b) hafi lokið grunn- og reglubundinni verndarþjálfun til að vera meðvitað um þá ábyrgð sem það ber, með tilliti til flugverndar, í samræmi við kröfur sem staðaryfirvöld gera til athafnasvæðis KC3-sendandans sem fengið fullgildingu.

Athugasemd:

— Bakgrunnsskoðun felur í sér athugun á deili einstaklings og fyrri reynslu hans, þ.m.t., ef lög heimila það, á mögulegum afbrotaferli hans sem er hluti af mati á hæfi einstaklingsins til að framkvæma flugverndarráðstafanir eða að fá aðgang án fylgdar að haftasvæðum flugverndar (skilgreining í 17. viðauka Alþjóðaflugmálastofnunarinnar).

— Við athugun í aðdraganda ráðningar skal staðfesta deili á einstaklingnum á grundvelli skjalfestra sönnunargagna, fara yfir ráðningarsögu, menntun og hvers konar starfsrof a.m.k. næstliðin fimm ár ásamt því að fara fram á að einstaklingurinn undirriti yfirlýsingu um hugsanlegan afbrotaferil í öllum búseturíkjum a.m.k. næstliðin fimm ár (skilgreining Sambandsins).

Tilvísun: liður 6.8.3.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

4.1. Er verklag fyrir hendi sem tryggir að allt starfsfólk, sem hefur aðgang að auðgreinanlegum flugfarmi eða flugpósti, sæti athugun í aðdraganda ráðningar þar sem lagt er mat á bakgrunn þess og hæfni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal tilgreina þann fjölda næstliðinna ára sem tekið er tillit til við athugun í aðdraganda ráðningar og tilgreina hvaða eining framkvæmir athugunina.	

4.2. Felur þetta verklag í sér?

☐ bakgrunnsskoðun ☐ athugun í aðdraganda ráðningar ☐ athugun á sakaskrá ☐ viðtöl ☐ annað (nánari upplýsingar)	
Gera skal grein fyrir framangreindum þáttum, tilgreina hvaða eining framkvæmir þennan þátt og, eftir atvikum, næstliðið tímabil sem tekið er til athugunar.	

4.3. Er verklag fyrir hendi sem tryggir að einstaklingur, sem ber ábyrgð á beitingu og umsjón með framkvæmd flugverndarráðstafana á starfsstöð, sæti athugun í aðdraganda ráðningar þar sem lagt er mat á bakgrunn hans og hæfni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal tilgreina þann fjölda næstliðinna ára sem tekið er tillit til við athugun í aðdraganda ráðningar og tilgreina hvaða eining framkvæmir athugunina.	

4.4. Felur þetta verklag í sér?

☐ bakgrunnsskoðun, ☐ athugun í aðdraganda ráðningar ☐ athugun á sakaskrá ☐ viðtöl ☐ annað (nánari upplýsingar) Gera skal grein fyrir framangreindum þáttum, tilgreina hvaða eining framkvæmir þennan þátt og, eftir atvikum, næstliðið tímabil sem tekið er til athugunar.	

4.5. Fær starfsfólk, sem hefur aðgang að auðgreinanlegum flugfarmi eða flugpósti, þjálfun áður en það fær þennan aðgang?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa inntaki og lengd þjálfunarinnar	

4.6. Fær starfsfólkið, sem um getur í lið 4.5, reglubundna þjálfun?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal tilgreina þætti og tíðni reglubundnu þjálfunarinnar	

4.7. Niðurstaða: tryggja ráðstafanir, sem gerðar eru vegna ráðningar og þjálfunar starfsfólks, að allt starfsfólk, sem hefur aðgang að auðgreinanlegum farmi eða pósti, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, hafi verið ráðið til starfa með tilhlýðilegum hætti og að það hafi hlotið tilhlýðilega þjálfun til að það geri sér grein fyrir þeirri ábyrgð sem það ber með tilliti til flugverndar?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

5. HLUTI

Efnislegt öryggi

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin. Ef slíkur farmur eða póstur er ekki varinn er ekki heimilt að senda hann áfram til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm eða póst.

Einingin verður að sýna fram á hvernig starfsstöð hennar eða athafnasvæði er varið og að fyrir hendi sé viðeigandi verklag um aðgangsstýringu. Mikilvægt er að stýra aðgangi að svæðinu þar sem auðgreinanlegur flugfarmur eða flugpóstur er meðhöndlaður eða geymdur. Vernda þarf allar dyr, glugga og aðrar aðgangsleiðir til að vernda farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, eða viðhafa aðgangsstýringu.

Efnisleg vernd getur verið en takmarkast þó ekki við:

— efnislegar hindranir, t.d. girðingar eða fyrirstöður,

— tækni, með því að nota viðvörunarkerfi og/eða lokað eftirlitsmyndavélakerfi (CCTV),

— mannlega vernd, t.d. starfsfólk sem eingöngu sinnir eftirlitsstarfi.

Tilvísun: liður 6.8.3.1 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

5.1. Eru allar aðgangsleiðir að auðgreinanlegum flugfarmi eða flugpósti háðar aðgangsstýringu og takmarkast aðgangur við starfsmenn með aðgangsheimild?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig er aðgangsstýringu háttað? Skýra skal og lýsa. Hér geta verið fleiri en einn svarmöguleiki. ☐ flugverndarstarfsfólk sér um aðgangsstýringu ☐ annað starfsfólk sér um aðgangsstýringu ☐ handvirk skoðun ef einstaklingum er heimilt að fara inn á svæðið ☐ rafrænt aðgangsstýrikerfi ☐ annað, tilgreina skal nánar	
Ef svarið er JÁ, hvernig er tryggt að einstaklingurinn hafi heimild til að fara inn á svæðið? Skýra skal og lýsa. Hér geta verið fleiri en einn svarmöguleiki. — með því að nota auðkenniskort fyrirtækis — með því að nota annars konar auðkenniskort, t.d. vegabréf eða ökuskírteini — (flugverndar-) starfsfólk notar skrá yfir starfsmenn með aðgangsheimild — rafræn heimild, t.d. með því að nota flögu — úthlutun lykla eða aðgangskóða en einungis til starfsmanna með aðgangsheimild — annað, tilgreina skal nánar.	

5.2. Eru allar aðgönguleiðir að auðgreinanlegum flugfarmi eða flugpósti verndaðar? Hér eru meðtaldar aðgönguleiðir, sem eru ekki notaðar að staðaldri, og leiðir, sem eru venjulega ekki notaðar sem aðgönguleiðir, t.d. gluggar.

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig eru þessar aðgönguleiðir verndaðar? Skýra skal og lýsa. Hér geta verið fleiri en einn svarmöguleiki. — viðurvist verndarstarfsfólks — rafræn aðgangsstýrikerfi sem heimila aðgang eins einstaklings í senn — fyrirstöður, t.d. hlerar eða lásar — lokað eftirlitsmyndavélakerfi — innbrotaviðvörunarkerfi.	

5.3. Eru einhverjar viðbótarráðstafanir til að auka vernd á athafnasvæðinu almennt?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal skýra hverjar þær eru og lýsa þeim. ☐ girðingar eða fyrirstöður ☐ lokað eftirlitsmyndavélakerfi ☐ innbrotaviðvörunarkerfi ☐ eftirlit og eftirlitsferðir ☐ annað, tilgreina skal nánar	

5.4. Er byggingin traustbyggð?

JÁ eða NEI	

5.5. Niðurstaða: Gerir einingin fullnægjandi ráðstafanir til að koma í veg fyrir óheimilan aðgang að þeim hlutum starfsstöðvarinnar og athafnasvæðisins þar sem auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB EÐA EES, er meðhöndlaður eða geymdur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

6. HLUTI

Framleiðsla

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan á framleiðslu stendur. Ef slíkur farmur eða póstur er ekki varinn er ekki heimilt að senda hann áfram til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm eða póst.

Einingin verður að sýna fram á að aðgangi að framleiðslusvæðinu sé stýrt og umsjón sé höfð með framleiðsluferlinu. Ef framleiðsluvaran er auðgreinanleg sem farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES á framleiðsluferlinu, skal einingin, upp frá því, sýna fram á að ráðstafanir séu gerðar til að verja flugfarm eða flugpóst gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin. z

Svara skal þessum spurningum ef unnt er að auðgreina framleiðsluvöruna sem farm eða póst, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, meðan á framleiðsluferlinu stendur.

6.1. Er aðgangi að framleiðslusvæðinu stýrt og takmarkast aðgangur við starfsmenn með aðgangsheimild?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal skýra hvernig aðgangsstýringu er háttað og hvernig aðgangur takmarkast við starfsmenn með aðgangsheimild.	

6.2. Er umsjón höfð með framleiðsluferlinu?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa hvernig þeirri umsjón er háttað	

6.3. Eru gerðar ráðstafanir til að koma í veg fyrir að vernd framleiðsluvöru sé rofin á framleiðslustigi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

6.4. Niðurstaða: Gerir einingin fullnægjandi ráðstafanir til verja auðgreinanlegan farm eða póst, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, gegn því að vernd hans sé rofin á framleiðslustigi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

7. HLUTI

Pökkun

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan á framleiðslu stendur. Ef slíkur farmur eða póstur er ekki varinn er ekki heimilt að senda hann áfram til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm eða póst.

Einingin verður að sýna fram á að aðgangi að pökkunarsvæðinu sé stýrt og umsjón sé höfð með pökkunarferlinu. Ef framleiðsluvaran er auðgreinanleg sem farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, meðan á pökkun stendur, skal einingin, upp frá því, sýna að ráðstafanir séu gerðar til að verja flugfarm eða flugpóst gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin frá og með þessu stigi. Skoða þarf allar fullunnar vörur áður en þeim er pakkað.

Svara skal þessum spurningum ef unnt er að auðkenna framleiðsluvöruna sem farm eða póst sem fluttur er með flugi til ESB eða EES meðan á pökkunarferlinu stendur.

7.1. Er aðgangi að pökkunarsvæðinu stýrt og takmarkast aðgangur við starfsmenn með aðgangsheimild?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal skýra hvernig aðgangsstýringu er háttað og hvernig aðgangur takmarkast við starfsmenn með aðgangsheimild.	

7.2. Er umsjón höfð með pökkunarferlinu?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa hvernig þeirri umsjón er háttað	

7.3. Eru gerðar ráðstafanir til að koma í veg fyrir að vernd framleiðsluvöru sé rofin á pökkunarstigi?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

7.4. Lýsa skal fullfrágengnum ystu umbúðum:

a) Eru fullfrágengnar ystu umbúðir traustar?

JÁ eða NEI	
Lýsa skal nánar	

b) Sést það auðveldlega á fullfrágengnum ystu umbúðum ef vernd þeirra hefur verið rofin?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa því hvaða ferli er notað til að gera ystu umbúðir þannig úr garði að auðvelt sé að sjá hvort vernd þeirra hafi verið rofin, t.d. með því að nota innsiglisnúmer, sérstaka stimpla eða öryggislímband.	
Ef svarið er NEI skal lýsa því hvaða varnarráðstafanir eru gerðar til að tryggja heilleika sendinga.	

7.5. Niðurstaða: Gerir einingin fullnægjandi ráðstafanir til verja auðgreinanlegan farm eða póst, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan á pökkun stendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

8. HLUTI

Geymsla

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan hann er í geymslu. Ef slíkur farmur eða póstur er ekki varinn er ekki heimilt að senda hann áfram til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm eða póst.

Einingin verður að sýna fram á að aðgangi að geymslusvæðinu sé stýrt. Ef framleiðsluvaran er auðgreinanleg sem farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, meðan hún er í geymslu, skal einingin, upp frá því, sýna að ráðstafanir hafi verið gerðar til að verja flugfarm eða flugpóst gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin frá og með þessu stigi.

Svara skal þessum spurningum ef unnt er að auðgreina framleiðsluvöruna sem farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, meðan á geymsluferlinu stendur.

8.1. Er aðgangi að geymslusvæðinu stýrt og takmarkast aðgangur við starfsmenn með aðgangsheimild?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal skýra hvernig aðgangsstýringu er háttað og hvernig aðgangur takmarkast við starfsmenn með aðgangsheimild.	

8.2. Er fullfrágenginn og pakkaður flugfarmur eða flugpóstur geymdur á verndaðan hátt og gengið úr skugga um að vernd hans sé ekki rofin?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	
Ef svarið er NEI, skal skýra hvernig einingin tryggir að fullfrágenginn og pakkaður farmur og póstur, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi og að vernd hans sé ekki rofin.	

8.3. Niðurstaða: Gerir einingin fullnægjandi ráðstafanir til verja auðgreinanlegan farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan hann er í geymslu?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

9. HLUTI

Sending

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin í sendingarferlinu. Ef slíkur farmur eða póstur er ekki varinn skal ekki að senda hann áfram til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila sem verndaðan farm eða póst.

Einingin verður að sýna fram á að aðgangi að sendingarsvæðinu sé stýrt. Ef framleiðsluvaran er auðgreinanleg sem farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, meðan á sendingarferlinu stendur, skal einingin, upp frá því, sýna að ráðstafanir séu gerðar til að verja flugfarm eða flugpóst gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin frá og með þessu stigi.

Svara skal þessum spurningum ef unnt er að auðgreina framleiðsluvöruna sem farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, meðan á sendingarferlinu stendur.

9.1. Er aðgangi að sendingarsvæðinu stýrt og takmarkast aðgangur við starfsmenn með aðgangsheimild?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal skýra hvernig aðgangsstýringu er háttað og hvernig aðgangur takmarkast við starfsmenn með aðgangsheimild.	

9.2. Hver hefur aðgang að sendingarsvæðinu? Hér geta verið fleiri en einn svarmöguleiki.

☐ starfsfólk einingarinnar ☐ bílstjórar ☐ gestir ☐ verktakar ☐ aðrir, tilgreina skal nánar	

9.3. Er höfð umsjón með sendingaferlinu?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa hvernig þeirri umsjón er háttað	

9.4. Eru gerðar ráðstafanir til að koma í veg fyrir að vernd framleiðsluvara sé rofin á sendingarsvæðinu?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, skal lýsa því	

9.5. Niðurstaða: Gerir einingin fullnægjandi ráðstafanir til að verja auðgreinanlegan farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan á sendingarferlinu stendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

10. HLUTI

Sendingar frá öðrum aðilum

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að farmur eða póstur, sem á ekki uppruna sinn hjá honum, skuli ekki sendur áfram til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila sem verndaður farmur eða póstur.

KC3-sendanda er heimilt að afhenda RA3-umboðsaðila eða ACC3-flugrekanda sendingar sem eiga ekki uppruna sinn hjá honum, að því tilskildu að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

a) að þær séu aðskildar frá sendingum, sem eiga uppruna sinn hjá honum, og

b) að uppruni þeirra komi skýrt fram á sendingunni eða á meðfylgjandi gögnum.

RA3-umboðsaðili eða ACC3-flugrekandi skal skima allar slíkar sendingar áður en þær eru settar um borð í loftfar.

10.1. Tekur einingin við farm- eða póstsendingum, sem ætlunin er að senda með flugi, frá einhverri annarri einingu?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig er þessum sendingum haldið aðskildum frá farmi eða pósti fyrirtækisins og hvernig eru þær auðgreindar fyrir viðurkenndan umboðsaðila eða farmflytjanda?	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar.	

11. HLUTI

Gögn

Markmið: KC3-sendandinn skal sjá til þess að í gögnunum, sem fylgja sendingu sem hann hefur viðhaft flugverndarráðstafanir gagnvart (t.d. vernd), komi a.m.k. fram:

a) einstaka alstafakennimerkið, sem hlutaðeigandi yfirvald sem veitir tilnefningu, úthlutaði og

b) innihald sendingarinnar.

Gögnin sem fylgja sendingunni mega vera hvort sem er á rafrænu eða skriflegu formi.

Tilvísun: liður 6.8.3.4 í viðaukanum við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998.

11.1. Sér einingin til þess að viðeigandi fylgigögn séu útbúin, sem innihalda einstaka alstafamerkið sem hlutaðeigandi yfirvald, sem veitir tilnefningu, úthlutaði, ásamt lýsingu á sendingunni?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal útskýra af hverju svo er ekki	

11.2. Niðurstaða: Er gagnaferlið fullnægjandi til að tryggja að farmi eða pósti fylgi viðeigandi gögn?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæðu	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

12. HLUTI

Flutningar

Markmið: KC3-sendandi skal hafa verklag fyrir hendi til að tryggja að auðgreinanlegur farmur eða póstur, sem flytja á með flugi til ESB eða EES, sé varinn gegn óheimilum aðgangi eða gegn því að vernd hans sé rofin meðan á flutningi hans stendur. Ef slíkur farmur eða póstur er ekki varinn skal ACC3-flugrekandi eða RA3-umboðsaðili ekki taka við honum sem vernduðum farmi eða pósti.

Meðan á flutningi stendur ber KC3-sendandi ábyrgð á því að verja verndaðar sendingar. Þetta felur m.a. í sér tilvik þegar önnur eining sér um flutninginn fyrir hans hönd, eins og t.d. farmmiðlari. Þetta á ekki við um tilvik þegar sendingar eru fluttar á ábyrgð ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila.

Svara skal þessum spurningum ef unnt er að auðgreina framleiðsluvöruna sem farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ESB eða EES, meðan á flutningi stendur.

12.1. Hvernig er flugfarmur eða flugpóstur fluttur til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila?

a) Sér einingin, sem hefur fengið fullgildingu, sjálf um flutninginn?

JÁ eða NEI	

b) Sér ACC3-flugrekandi eða RA3-umboðsaðili um flutninginn?

JÁ eða NEI	

c) Notar einingin, sem hefur fengið fullgildingu, verktaka?

JÁ eða NEI	

12.2. Er flugfarminum eða flugpóstinum pakkað þannig að augljóst sé hvort vernd hans hafi verið rofin?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig?	

12.3. Er ökutækið innsiglað eða því læst áður en flutningur á því hefst?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ, hvernig?	

12.4. Í þeim tilvikum sem innsiglisnúmer eru notuð er þá aðgangi að innsiglum stýrt og eru númerin skráð?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er já skal tilgreina hvernig	

12.5. Skrifar viðkomandi farmflytjandi undir yfirlýsingu farmflytjanda, ef við á?

JÁ eða NEI	

12.6. Hefur einstaklingur, sem flytur farminn, gengist undir sérstaka þjálfun í flugverndarráðstöfunum og flugverndarvitund áður en honum var heimilað að flytja verndaðan flugfarm eða flugpóst eða hvort tveggja?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er JÁ skal lýsa viðkomandi tegund flugverndarráðstafana (t.d. athugun í aðdraganda ráðningar, bakgrunnsskoðun) og tegund þjálfunar (t.d. þjálfun í flugverndarvitund o.s.frv.) sem um er að ræða.	

12.7. Niðurstaða: Eru ráðstafanir fullnægjandi til að verja flugfarm eða flugpóst gegn óheimilum aðgangi meðan á flutningi stendur?

JÁ eða NEI	
Ef svarið er NEI, skal tilgreina ástæður.	
Athugasemdir frá einingunni	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	

13. HLUTI

Reglufylgni

Markmið: Eftir að hafa lagt mat á framangreinda tólf hluta þessa gátlista skal ESB-matsmaður flugverndar komast að niðurstöðu um það hvort sannprófun hans á starfsstöð staðfesti framkvæmd flugverndarráðstafana í samræmi við markmið þessa gátlista fyrir farm eða póst sem fluttur er með flugi til ESB eða EES.

Tvær atburðarásir eru mögulegar. ESB-matsmaður flugverndar kemst að þeirri niðurstöðu að einingunni:

1) hafi tekist að ná markmiðunum sem um getur í þessum gátlista; fullgildingarskýrsluna skal afhenda hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, og einingunni, sem hefur fengið fullgildingu, innan eins mánaðar hið lengsta eftir að sannprófun á starfsstöð hefur farið fram;
2) hafi ekki tekist að ná markmiðunum sem um getur á þessum gátlista. Í slíku tilviki er einingunni ekki heimilt að afhenda ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila farm eða póst, sem fluttur er með flugi til ákvörðunarstaðar í ESB eða EES, án þess að aðili, sem hefur til þess heimild, hafi skimað hann. Einingin skal fá eintak af fullgerðum gátlista þar sem frávikin koma fram.

ESB-matsmaður flugverndar verður að hafa í huga að matið byggist á heildstæðri og hlutlægri aðferð.

12.1. Almennar niðurstöður: Tilgreina skal þá atburðarás sem best samsvarar aðstæðunum sem hafa fengið fullgildingu

1 eða 2	
Athugasemdir frá ESB-matsmanni flugverndar	
Athugasemdir frá einingunni	

Nafn matsmanns:

Dagsetning:

Undirskrift:

———

VIÐAUKI

Skrá yfir einstaklinga og einingar sem hafa verið heimsótt og viðtöl tekin við

Tilgreina skal heiti einingar, nafn og stöðu tengiliðar og hvenær heimsókn eða viðtal fór fram.

Heiti einingar	Nafn tengiliðar	Staða tengiliðar	Dagsetning heimsóknar eða viðtals“,

33) í stað fylgiskjala 6-H1, 6-H2 og 6-H3 komi eftirfarandi:

FYLGISKJAL 6-H1

YFIRLÝSING UM SKULDBINDINGAR — ACC3-FLUGREKANDI MEÐ ESB-FULLGILDINGU FLUGVERNDAR

Fyrir hönd [nafn flugrekanda] tek ég mið af eftirfarandi:

Í þessari skýrslu er ákvarðað flugverndarstig fyrir vinnu við farm, sem er fluttur með flugi til ESB eða EES, að því er varðar verndarkröfurnar sem taldar eru upp í gátlistanum eða sem um getur í honum.

Einungis er unnt að tilnefna [heiti flugrekanda] sem „flugrekanda sem flytur flugfarm eða flugpóst inn í Sambandið frá flugvelli í þriðja landi“ (ACC3-flugrekanda) þegar hlutaðeigandi yfirvald aðildarríkis Evrópusambandsins eða Íslands, Noregs eða Sviss hefur, í þeim tilgangi, tekið við og samþykkt ESB-fullgildingarskýrslu um flugvernd og upplýsingar um ACC3-flugrekandann hafa verið færðar í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju.

Ef hlutaðeigandi yfirvald ESB-aðildarríkis eða framkvæmdastjórn Evrópusambandsins sannreynir að ekki sé farið að verndarráðstöfunum sem skýrslan vísar til, gæti það leitt til afturköllunar á tilnefningu [heiti flugrekanda] sem ACC3-flugrekanda, sem þegar hefur fengist fyrir þennan flugvöll, og mun það koma í veg fyrir að [nafn flugrekanda] geti flutt flugfarm eða flugpóst til ESB eða EES frá þessum flugvelli.

Skýrslan gildir í fimm ár og fellur því úr gildi eigi síðar en ... .

Fyrir hönd [flugrekanda] lýsi ég því yfir að:

1) [heiti flugrekanda] mun samþykkja viðeigandi framhaldsaðgerðir í þeim tilgangi að vakta kröfurnar sem staðfestar eru í skýrslunni.

2) Ég mun veita hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, viðeigandi upplýsingar tafarlaust og a.m.k. innan 15 virkra daga ef:

   a) einhverjar breytingar verða á flugverndaráætlun [heiti flugrekanda],

   b) heildarábyrgð á vernd er úthlutuð einhverjum öðrum en einstaklingnum sem tilgreindur er í lið 1.7 í fylgiskjali 6-C3 við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998,

   c) ef einhverjar aðrar breytingar verða á athafnasvæði eða verklagi sem líklegt er að hafi veruleg áhrif á vernd,

   d) flugrekandinn hættir starfsemi, hættir að meðhöndla flugfarm eða flugpóst sem er á leið til Sambandsins eða getur ekki lengur uppfyllt kröfur viðeigandi löggjafar Sambandsins sem hafa fengið fullgildingu í þessari skýrslu.

3) að [heiti flugrekanda] mun viðhalda verndarstiginu, sem staðfest er í þessari skýrslu, í samræmi við markmiðin, sem sett eru fram í þessum gátlista, og, eftir því sem við á, framkvæma og beita viðbótarverndarráðstöfunum, sem gerð er krafa um, til að hljóta tilnefningu sem ACC3-flugrekandi, ef staðfest hefur verið að verndarkröfurnar séu ófullnægjandi, þar til starfsemi [heiti flugrekanda] fær fullgildingu síðar.

4) [heiti flugrekanda] mun tilkynna hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, um það ef hann getur ekki farið fram á, óskað eftir eða séð til þess að gerðar séu flugöryggisráðstafanir að því er varðar farm eða póst, sem flytja á til ESB eða EES-svæðisins, eða ef hann getur ekki haft skilvirkt eftirlit með aðfangakeðju sinni.

Fyrir hönd [heiti flugrekanda] tek ég fulla ábyrgð á þessari yfirlýsingu.

Nafn:

Staða innan fyrirtækis:

Dagsetning:

Undirskrift:

FYLGISKJAL 6-H2

YFIRLÝSING UM SKULDBINDINGAR — VIÐURKENNDUR UMBOÐSAÐILI Í ÞRIÐJA LANDI MEÐ ESB-FULLGILDINGU FLUGVERNDAR (RA3-UMBOÐSAÐILI)

Fyrir hönd [heiti einingar] tek ég mið af eftirfarandi:

Í þessari skýrslu er ákvarðað flugverndarstig fyrir vinnu við farm, sem er fluttur með flugi til ESB eða EES, að því er varðar verndarkröfurnar sem taldar eru upp í gátlistanum eða sem um getur í honum.

Einungis er unnt að tilnefna [heiti einingar] sem „viðurkenndan umboðsaðila í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar“ (RA3-umboðsaðila) þegar hlutaðeigandi yfirvald aðildarríkis Evrópusambandsins eða Íslands, Noregs eða Sviss hefur, í þeim tilgangi, tekið við og samþykkt ESB-fullgildingarskýrslu um flugvernd og upplýsingar um RA3-umboðsmanninn hafa verið færðar í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju.

Ef hlutaðeigandi yfirvald ESB-aðildarríkis eða framkvæmdastjórn Evrópusambandsins sanngreinir að ekki sé farið að verndarráðstöfunum sem vísað er til í skýrslunni, gæti það leitt til afturköllunar á tilnefningu [heiti einingar] sem RA3-umboðsaðila, sem þegar hefur fengist fyrir þetta athafnasvæði, og mun það koma í veg fyrir að [heiti einingar] geti flutt verndaðan flugfarm eða flugpóst til ACC3-flugrekanda eða annars RA3-umboðsaðila á áfangastað í ESB eða EES.

Skýrslan gildir í þrjú ár og fellur því úr gildi eigi síðar en ... .

Fyrir hönd [heiti einingar] lýsi ég því yfir:

1) að [heiti einingar] mun samþykkja viðeigandi framhaldsaðgerðir í þeim tilgangi að vakta kröfurnar sem staðfestar eru í skýrslunni.

2) Ég mun veita hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, viðeigandi upplýsingar tafarlaust og a.m.k. innan 15 daga:

   a) ef einhverjar breytingar verða á flugverndaráætlun [heiti einingar],

b) ef heildarábyrgð á vernd er úthlutuð einhverjum öðrum en einstaklingnum sem tilgreindur er í lið 1.9 í fylgiskjali 6-C2 við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998,

c) ef einhverjar aðrar breytingar verða á athafnasvæði eða verklagi sem líklegt er að hafi veruleg áhrif á vernd,

d) ef fyrirtækið hættir starfsemi, hættir að meðhöndla flugfarm eða flugpóst sem er á leið til Evrópusambandsins eða getur ekki lengur uppfyllt kröfur viðeigandi löggjafar Sambandsins sem hafa fengið fullgildingu í þessari skýrslu.

3) að [heiti einingar] mun viðhalda verndarstiginu, sem staðfest er í þessari skýrslu, í samræmi við markmiðin, sem sett eru fram í gátlistanum og, eftir því sem við á, framkvæma og beita viðbótarverndarráðstöfunum, sem gerð er krafa um, til að öðlast tilnefningu sem RA3-umboðsaðili, ef staðfest hefur verið að verndarkröfurnar séu ófullnægjandi, þar til starfsemi [heiti einingar] fær fullgildingu síðar.

4) að [heiti einingar] mun tilkynna ACC3-flugrekendum og RA3-umboðsaðilum, sem hann afhendir verndaðan flugfarm og/eða flugpóst, um það ef [heiti einingar] hættir viðskiptum, hættir að meðhöndla flugfarm/flugpóst eða getur ekki lengur uppfyllt kröfurnar sem eru fullgiltar í þessari skýrslu.

Fyrir hönd [heiti einingar] tek ég fulla ábyrgð á þessari yfirlýsingu.

Nafn:

Staða innan fyrirtækis:

Dagsetning:

Undirskrift:

FYLGISKJAL 6-H3

YFIRLÝSING UM SKULDBINDINGAR — ÞEKKTUR SENDANDI Í ÞRIÐJA LANDI MEÐ ESB-FULLGILDINGU FLUGVERNDAR (KC3-SENDANDI)

Fyrir hönd [heiti einingar] tek ég mið af eftirfarandi:

Í þessari skýrslu er ákvarðað flugverndarstig fyrir vinnu við farm, sem er fluttur með flugi til ESB eða EES, að því er varðar verndarkröfurnar sem taldar eru upp í gátlistanum eða sem um getur í honum.

Einungis er unnt að tilnefna [heiti einingar] sem „þekktan sendanda í þriðja landi með ESB-fullgildingu flugverndar “ (KC3-sendanda) þegar hlutaðeigandi yfirvald aðildarríkis Evrópusambandsins eða Íslands, Noregs eða Sviss hefur, í þeim tilgangi, tekið við og samþykkt ESB-fullgildingarskýrslu um flugvernd og upplýsingar um KC3-sendandann hafa verið færðar í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju.

Ef hlutaðeigandi yfirvald ESB-aðildarríkis eða framkvæmdastjórn Evrópusambandsins sanngreinir að ekki sé farið að verndarráðstöfunum, sem vísað er til í skýrslunni, gæti það leitt til afturköllunar á tilnefningu [heiti einingar] sem KC3-sendanda, sem þegar hefur fengist fyrir þetta athafnasvæði, og mun það koma í veg fyrir að [heiti einingar] geti flutt verndaðan flugfarm eða flugpóst til ACC3-flugrekanda eða RA3-umboðsaðila á áfangastað í ESB eða EES.

Skýrslan gildir í þrjú ár og fellur því úr gildi eigi síðar en ... .

Fyrir hönd [heiti einingar] lýsi ég því yfir:

1) að [heiti einingar] mun samþykkja viðeigandi framhaldsaðgerðir í þeim tilgangi að vakta kröfurnar sem staðfestar eru í skýrslunni,

2) Ég mun veita hlutaðeigandi yfirvaldi, sem veitir tilnefningu, viðeigandi upplýsingar tafarlaust og a.m.k. innan 15 daga:

a) ef einhverjar breytingar verða á flugverndaráætlun [heiti einingar],

b) heildarábyrgð á vernd er úthlutuð einhverjum öðrum en einstaklingnum sem tilgreindur er í lið 1.9 í fylgiskjali 6-C4 við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2015/1998,

c) ef einhverjar aðrar breytingar verða á athafnasvæði eða verklagi sem líklegt er að hafi veruleg áhrif á vernd,

d) ef fyrirtækið hættir viðskiptum, hættir að meðhöndla flugfarm eða flugpóst sem er á leið til Evrópusambandsins eða getur ekki lengur uppfyllt kröfur viðeigandi löggjafar Sambandsins sem hafa fengið fullgildingu í þessari skýrslu.

3) að [heiti einingar] mun viðhalda verndarstiginu, sem staðfest er í þessari skýrslu, í samræmi við markmiðin, sem sett eru fram í þessum gátlista, og, eftir því sem við á, framkvæma og beita viðbótarverndarráðstöfunum, sem gerð er krafa um, til að öðlast tilnefningu sem KC3-sendandi, ef staðfest hefur verið að verndarkröfurnar séu ófullnægjandi, þar til starfsemi [heiti einingar] fær fullgildingu síðar.

4) að [heiti einingar] mun tilkynna ACC3-flugrekendum og RA3-umboðsaðilum, sem hann afhendir verndaðan flugfarm og/eða flugpóst, um það ef [heiti einingar] hættir viðskiptum, hættir að meðhöndla flugfarm/flugpóst eða getur ekki lengur uppfyllt kröfurnar sem eru fullgiltar í þessari skýrslu.

Fyrir hönd [heiti einingar] tek ég fulla ábyrgð á þessari yfirlýsingu.

Nafn:

Staða innan fyrirtækis:

Dagsetning:

Undirskrift:“.

34) Lið 8.1.3.2 er breytt sem hér segir:

a) Í stað c-liðar komi eftirfarandi:

„c) ef hlutaðeigandi yfirvald telur að upplýsingarnar, sem veittar eru í samræmi við a- og b-lið, séu fullnægjandi skal það tryggja að nauðsynlegar upplýsingar um viðurkennda birginn séu færðar í gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju eigi síðar en næsta virka dag. Við færsluna í gagnagrunninn skal hlutaðeigandi yfirvald úthluta hverri samþykktri starfsstöð einstöku alstafakennimerki á stöðluðu sniði; ef hlutaðeigandi yfirvald telur upplýsingarnar ófullnægjandi skal einingunni, sem sækir um samþykki sem viðurkenndur birgir, tafarlaust tilkynnt um ástæður þess,“.

b) Eftirfarandi d-liður bætist við:

„d) viðurkenndur birgir telst ekki samþykktur fyrr en upplýsingarnar um hann hafa verið skráðar í „gagnagrunn Sambandsins um verndaða aðfangakeðju.“

35) í stað e-liðar liðar 11.2.2 komi eftirfarandi:

„e) þekkingu á auðkenniskortakerfum sem eru í notkun,“.

36) Í lið 11.2.3.8 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Ef einstaklingur hefur undir höndum flugvallarskilríki skal hann að auki, að lokinni þjálfun, einnig búa yfir eftirfarandi hæfni:

h) skilningi á fyrirkomulagi á skimunarstað flugverndar og skimunarferlisins,

i) þekkingu á aðgangsstýringu og viðeigandi verklagi við skimun,

j) þekkingu á flugvallarskilríkjum sem notuð eru á flugvellinum,

k) þekkingu á verklagi um skýrslugjöf,

l) getu til að bregðast á réttan hátt við atvikum sem tengjast flugvernd.“,

37) Í lið 11.2.3.9 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Ef einstaklingur hefur undir höndum flugvallarskilríki skal hann að auki, að lokinni þjálfun, einnig búa yfir eftirfarandi hæfni:

k) skilningi á fyrirkomulagi á skimunarstað flugverndar og skimunarferlisins,

l) þekkingu á aðgangsstýringu og viðeigandi verklagi við skimun,

m) þekkingu á auðkenniskortum sem eru í notkun,

n) getu til að bregðast á réttan hátt við atvikum sem tengjast flugvernd.“,

38) í lið 11.2.3.10 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Ef einstaklingur hefur undir höndum flugvallarskilríki skal hann að auki, að lokinni þjálfun, einnig búa yfir eftirfarandi hæfni:

k) skilningi á fyrirkomulagi á skimunarstað flugverndar og skimunarferlisins,

l) þekkingu á aðgangsstýringu og viðeigandi verklagi við skimun,

m) þekkingu á auðkenniskortum sem eru í notkun,

n) getu til að bregðast á réttan hátt við atvikum sem tengjast flugvernd.“,

39) í lið 11.5.1 bætist eftirfarandi málsgrein við:

„Leiðbeinendur skulu gangast undir endurvottun a.m.k. fimmta hvert ár.“,

40) í stað liðar 11.6.4.3 komi eftirfarandi:

„11.6.4.3 Ef aðildarríki telur að ESB-matsmaður flugverndar uppfylli ekki lengur kröfurnar, sem um getur í lið 11.6.3.1 eða 11.6.3.5, skal það draga samþykkið til baka og fella matsmanninn brott úr gagnagrunni Sambandsins um verndaða aðfangakeðju, eða tilkynna það hlutaðeigandi yfirvaldi, sem viðurkenndi hann, og gefa upp ástæður efasemda sinna.“,

41) í stað fylgiskjals 11-A komi eftirfarandi:

FYLGISKJAL 11-A

YFIRLÝSING UM SJÁLFSTÆÐI — ESB-MATSMAÐUR FLUGVERNDAR

a) Ég staðfesti að ég hef ákvarðað samræmisstig einingarinnar, sem fengið hefur fullgildingu, af óhlutdrægni og á hlutlægan hátt.

b) Ég staðfesti að ég starfa ekki, og hef ekki, á næstliðnum tveimur árum, starfað hjá einingunni sem fengið hefur fullgildingu.

c) Ég staðfesti að ég hef hvorki fjárhagslega né aðra beina eða óbeina hagsmuni af niðurstöðu fullgildingar á starfsemi einingarinnar, sem fengið hefur fullgildingu, eða hlutdeildarfélögum hennar.

d) Ég staðfesti að ég hef ekki og hef ekki haft, á næstliðnum 12 mánuðum, nein viðskiptatengsl, s.s. þjálfun og ráðgjöf umfram fullgildingarferlið, við einingunа, sem fengið hefur fullgildingu, á sviðum sem varða flugvernd.

e) Ég staðfesti að ESB-fullgildingarskýrslan um flugvernd er byggð á ítarlegu staðreyndamati á viðeigandi gögnum um vernd sem samanstanda af:

— flugverndaráætlun einingarinnar, sem fengið hefur fullgildingu, eða jafngildi hennar og

— sannprófun á framkvæmd þessa á starfsstöð.

f) Ég staðfesti að ESB-fullgildingarskýrsla um flugvernd er byggð á mati á öllum viðeigandi sviðum verndar þar sem matsmanni ber að gefa álit sitt, byggt á viðeigandi ESB-gátlista.

g) Ég staðfesti að ég hef notað aðferð, sem gerir mögulegt að leggja fram aðskildar ESB-fullgildingarskýrslur um flugvernd, að því er varðar hverja einingu, sem fengið hefur fullgildingu, sem tryggir hlutlægni og óhlutdrægni við öflun og mat staðreynda, þegar unnið er að því að fullgilda nokkrar einingar í sameiginlegri aðgerð.

h) Ég staðfesti að ég hef hvorki tekið á móti fjárhagslegum ávinningi né annars konar ávinningi, að undanskildu hóflegu gjaldi fyrir fullgildingu og endurgreiðslu á ferða- og gistikostnaði.

Ég tek fulla ábyrgð á ESB-fullgildingarskýrslu um flugvernd.

Heiti einingar sem hefur fengið fullgildingu:

Nafn ESB-matsmanns flugverndar:

Dagsetning:

Undirskrift:“,

42) í stað liða 12.7.1.2. og 12.7.1.3. komi eftirfarandi:

„12.7.1.2 Búnaðurinn skal notaður þannig að öruggt sé að ílátinu sé komið fyrir og snúið þannig að hægt sé að tryggja að greiningargeta búnaðarins sé nýtt til fulls.

12.7.1.3 Búnaðurinn skal gefa frá sér viðvörunarmerki við eftirfarandi aðstæður:

a) þegar hann greinir hættuleg efni,

b) þegar hann greinir hlut sem kemur í veg fyrir að hættulegt efni greinist,

c) þegar hann getur ekki metið hvort vökvinn, úðaefnið eða gelið sé skaðlaust eða ekki,

d) þegar innihaldi skimaðrar tösku er of þétt pakkað til að hægt sé að greina það.“,

43) liður 12.7.1.4 falli brott,

44) í stað liðar 12.7.2.2 komi eftirfarandi:

„12.7.2.2 Allur búnaður til greiningar sprengiefnis í fljótandi formi skal uppfylla staðal 2.“,

45) liður 12.7.2.3 falli brott,

46) í stað liðar 12.9.2.5 komi eftirfarandi:

„12.9.2.5 Sprengjuleitarhundur, sem notaður er til að greina sprengiefni, skal útbúinn á viðeigandi hátt til unnt sé að auðkenna hann með ótvíræðum hætti.“

_____

FRAMSELD REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2016/2072 2017/EES/74/18

frá 22. september 2016

um sannprófunarstörf og faggildingu sannprófenda samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 frá 29. apríl 2015 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum og um breytingu á tilskipun 2009/16/EB ([1]), einkum 5. mgr. 15. gr. og 3. mgr. 16. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Í 5. mgr. 15. gr. og 3. mgr. 16. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 er kveðið á um að framkvæmdastjórnin eigi að samþykkja framseldar gerðir þar sem mælt er fyrir um frekari reglur um sannprófunarstörf og um aðferðir við að faggilda sannprófendur. Það eð þessi störf og þessar aðferðir tengjast efnislega er stuðst við báða þessa lagagrunna í þessari reglugerð.

2) Til að framkvæma megi ákvæði 5. mgr. 15. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 þarf heildarramma um reglur til að tryggja að mat á vöktunaráætlunum og sannprófun á losunarskýrslum, sem komið er á samkvæmt þessari reglugerð, sé framkvæmt á samræmdan hátt af sannprófendum sem búa yfir tæknilegri færni til að inna af hendi, með óháðum og óhlutdrægum hætti, þau verkefni sem þeim eru falin.

3) Við framkvæmd 3. mgr. 16. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 er nauðsynlegt að tryggja samvirkni milli heildarrammans um faggildingu, sem komið var á fót með reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 765/2008 ([2]), og sérkenna sannprófunar- og faggildingarstarfa sem varða losun koltvísýrings frá sjóflutningum. Reglugerð (EB) nr. 765/2008 skal, í samræmi við 2. mgr. 16. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, gilda um þætti í faggildingu sannprófenda sem ekki er fjallað um í reglugerð (ESB) 2015/757.

4) Til að tryggja að uppgefin gögn séu áreiðanleg og traust er nauðsynlegt að tryggja að óháðir og hæfir sannprófendur framkvæmi sannprófunina. Forðast ætti að sannprófunar- og faggildingarkerfið feli í sér óþarfa tvítekningu á aðferðum og stofnunum sem komið er á fót samkvæmt öðrum lagagerningum Sambandsins sem myndi valda aðildarríkjum eða rekstraraðilum auknum byrðum. Þess vegna þykir rétt að líta til bestu starfsvenja, sem tilkomnar eru við beitingu samræmdra staðla sem Staðlasamtök Evrópu samþykktu á grundvelli heimildar frá framkvæmdastjórninni í samræmi við tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 98/34/EB ([3]), (s.s. þeirra sem varða kröfur um fullgildingar- og sannprófunaraðila í tengslum við gróðurhúsalofttegundir til notkunar við faggildingu eða annars konar viðurkenningu, og almennar kröfur um faggildingarstofur, sem sinna faggildingu aðila sem annast samræmismat, ef tilvísanir í þá hafa verið birtar í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*), sem og skjals EA-6/03 og annarra tækniskjala sem Evrópusamtök um faggildingu hafa þróað.

5) Ábyrgð og starfsemi sannprófenda ætti að koma skýrt fram í samræmdum reglum um mat á vöktunaráætlunum, sannprófun á losunarskýrslum og útgáfu sannprófenda á samræmingarskjölum.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 320, 26.11.2016, bls. 5. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 205/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XX. viðauka (Umhverfismál) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 123, 19.5.2015, bls. 55.

([2]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 765/2008 frá 9. júlí 2008 um kröfur varðandi faggildingu og markaðseftirlit í tengslum við markaðssetningu á vörum og um niðurfellingu reglugerðar (EBE) nr. 339/93 (Stjtíð. ESB L 218, 13.8.2008, bls. 30).

([3]) Tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 98/34/EB frá 22. júní 1998 sem setur reglur um tilhögun upplýsingaskipta vegna tæknilegra staðla og reglugerða sem og reglna um þjónustu í upplýsingasamfélaginu (Stjtíð. EB L 204, 21.7.1998, bls. 37).

6) Við mat á eftirlitsáætlun ættu sannprófendur að framkvæma ákveðnar aðgerðir sem miða að því að meta heilleika, mikilvægi og samræmi upplýsinganna, sem viðkomandi fyrirtæki leggur fram um vöktunar- og skýrslugjafarferli skipsins, til að geta ályktað um það hvort áætlunin samrýmist reglugerð (ESB) 2015/757.

7) Samkvæmt framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1927 ([1]) er fyrirtækjum heimilt, þegar þau leggja fram vöktunaráætlun skips, að vísa til upplýsinga um fyrirliggjandi aðferðir og eftirlit sem falla undir samræmda gæða-, umhverfis- og orkustjórnunarstaðla (t.d. EN ISO 9001:2015, EN ISO 14001:2015, EN ISO 50001:2011) eða alþjóðakóðann um öryggisstjórnun skipa (ISM-kóðann) ([2]) eða stjórnunarkerfi fyrir orkunýtni skipa (SEEMP-áætlunina) ([3]). Til að tryggja hnökralausa nálgun ættu sannprófendur að geta litið til þeirra að því marki sem þeir varða vöktun og skýrslugjöf um gögn samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757 og þessari reglugerð.

8) Miðlun skjala og skipti á viðeigandi upplýsingum milli fyrirtækja og sannprófenda eru mikilvæg fyrir alla þætti sannprófunarferlisins, einkum fyrir matið á vöktunaráætluninni, framkvæmd áhættumatsins og sannprófunina á losunarskýrslunni. Nauðsynlegt er að setja samræmdar kröfur um miðlun upplýsinga og skjala sem gera skal tiltæk fyrir sannprófandann áður en hann hefur sannprófunarstörf sín og á öðrum tímapunktum meðan á sannprófuninni stendur.

9) Sannprófandinn ætti að nota áhættumiðaða nálgun við sannprófun á losunarskýrslunni, í samræmi við 1., 2. og 3. mgr. 15. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757. Greining á því hversu viðkvæm uppgefin gögn eru fyrir rangfærslum, sem geta verið verulegar, er mikilvægur hluti sannprófunarferlisins og ákvarðar hvernig sannprófandi ætti að haga sannprófunarstörfum sínum.

10) Allir þættir í sannprófunarferli losunarskýrslna, þ.m.t. vettvangsheimsóknir, eru nátengdir niðurstöðu greiningar á áhættunni á rangfærslum. Sannprófanda ætti að bera skylda til að breyta einu eða fleiri en einu af sannprófunarstörfunum í ljósi niðurstaðnanna og þeirra upplýsinga sem aflað er meðan á sannprófunarferlinu stendur, til þess að uppfylla kröfurnar um að öðlast fullnægjandi áreiðanleika.

11) Til að tryggja samkvæmni og sambærileika vaktaðra gagna til lengri tíma, í samræmi við 3. mgr. 4. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, ætti vöktunaráætlun, sem hefur verið metin sem viðunandi, að vera viðmiðunarpunktur sannprófandans þegar hann metur losunarskýrslu skips. Sannprófandinn ætti að meta hvort áætlunin og tilskildar aðferðir hafi verið framkvæmdar á réttan hátt. Hann tilkynnir fyrirtækinu um ósamræmi eða rangfærslur sem hann finnur. Sannprófandinn tilkynnir um óleiðréttar rangfærslur eða ósamræmi sem veldur verulegum skekkjum í sannprófunarskýrslu þar sem fram kemur að losunarskýrslan samrýmist ekki reglugerð (ESB) 2015/757 og þessari reglugerð.

12) Öll störf í sannprófunarferlinu fyrir losunarskýrsluna eru samtengd og þeim ætti að ljúka með útgáfu sannprófunarskýrslu sem inniheldur yfirlýsingu um niðurstöðu sannprófunarinnar. Áreiðanleikastigið ætti að vera í samræmi við það hversu ítarleg og nákvæm sannprófunarstörfin eru og samrýmast orðalagi sannprófunaryfirlýsingarinnar. Samræmdar kröfur um útfærslu sannprófunarstarfa og samræmingarskýrslna myndu tryggja að allir sannprófendur beittu sömu stöðlunum.

13) Hæfir sannprófendur og starfsmenn ættu að annast sannprófunarstörfin, þ.m.t. mat á vöktunaráætlunum og sannprófun á losunarskýrslum. Til að tryggja að þeir starfsmenn sem taka þátt í sannprófunarstörfunum séu hæfir til að framkvæma þau verkefni sem þeim eru falin ættu sannprófendur að koma á innra ferli og endurbæta það stöðugt. Viðmiðanir til að ákvarða hvort sannprófandi sé hæfur ættu að vera þær sömu í öllum aðildarríkjunum og ættu að vera sannprófanlegar, hlutlægar og gagnsæjar.

14) Til að stuðla að miklum gæðum í sannprófunarstörfum ætti að mæla fyrir um samræmdar reglur til að ákvarða hvort sannprófandi sé hæfur, óháður og óhlutdrægur og þar með fær um að framkvæma tilskilin störf.

([1]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1927 frá 4. nóvember 2016 um sniðmát fyrir vöktunaráætlanir, losunarskýrslur og samræmingarskjöl samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum (Stjtíð. ESB L 299, 5.11.2016, bls. 1).

([2]) Samþykkt af Alþjóðasiglingamálastofnuninni (IMO) með ályktun þingsins A.741(18).

([3]) Regla 22 í VI. viðauka við MARPOL-samninginn.

15) Heildarreglurammi um faggildingu lögaðila er nauðsynlegur til að tryggja að sannprófendur búi yfir þeirri tæknilegu færni sem þarf til að framkvæma þau störf sem þeim eru falin, á óháðan og óhlutdrægan hátt og í samræmi við þær kröfur og meginreglur sem settar eru fram í reglugerð (ESB) 2015/757, reglugerð (EB) nr. 765/2008 og þessari reglugerð.

16) Samkvæmt 2. mgr. 16. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 ættu 4.–12. gr. reglugerðar (EB) nr. 765/2008 að gilda um almennar meginreglur og kröfur sem varða faggildingarstofur í aðildarríkjunum.

17) Í samræmi við þá venju framkvæmdastjórnarinnar að hafa samráð við sérfræðinga þegar undirbúin eru drög að afleiddum gerðum var komið á fót „undirhóp fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun (MRV) sem fjallar um sannprófun og faggildingu á sviði sjóflutninga“ þar sem safnað var saman sérfræðingum frá aðildarríkjunum, úr atvinnulífinu og frá öðrum samtökum sem málið varðar, þ.m.t. borgaralegu samfélagi, innan vébanda evrópska samstarfsvettvangsins um sjálfbæra sjóflutninga (e. *European Sustainable Shipping Forum*). Undirhópurinn mælti með því að nokkrir þættir féllu undir þessa reglugerð. Allsherjarfundur evrópska samstarfsvettvangsins um sjálfbæra sjóflutninga studdi drögin að tilmælum hans um þessa þætti 28. júní 2016.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

I. KAFLI

ALMENN ÁKVÆÐI

1. gr.

Viðfangsefni

Í þessari reglugerð er mælt fyrir um ákvæði varðandi mat á vöktunaráætlunum og sannprófun á losunarskýrslum. Í henni er einnig mælt fyrir um kröfur að því er varðar hæfni og aðferðir.

Í þessari reglugerð er mælt fyrir um reglur um faggildingu og eftirlit faggildingarstofa í aðildarríkjunum með sannprófendum í samræmi við reglugerð (EB) nr. 765/2008.

2. gr.

Skilgreiningar

Í þessari reglugerð er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

1) „faggilding“: staðfesting faggildingarstofu aðildarríkis þess efnis að sannprófandi uppfylli kröfurnar, sem settar eru fram í samhæfðum stöðlum í skilningi 9. liðar 2. gr. reglugerðar (EB) nr. 765/2008, og kröfurnar sem settar eru fram í þessari reglugerð, og sé þar með hæfur til að annast sannprófunarstörfin skv. II. kafla,

2) „ósamræmi“ merkir eitt af eftirtöldu:

   a) að því er varðar mat á vöktunaráætlun, að áætlunin uppfylli ekki kröfurnar í 6. og 7. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 og framkvæmdarreglugerð (ESB) nr. 2016/1927,

   b) að því er varðar sannprófun á losunarskýrslunni, að ekki sé tilkynnt um losun koltvísýrings, og aðrar upplýsingar sem máli skipta, í samræmi við vöktunaraðferðina sem er lýst í vöktunaráætlun sem faggiltur sannprófandi hefur metið sem viðunandi,

   c) að því er varðar faggildingu, sérhver athöfn eða vanræksla sannprófanda sem er í andstöðu við kröfurnar samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757 og þessari reglugerð,

3) „fullnægjandi áreiðanleiki”: hátt en ekki fullkomið áreiðanleikastig, sem er tilgreint á skýran hátt í sannprófunaryfirlýsingunni, um það hvort losunarskýrslan, sem var sannprófuð, sé laus við verulegar rangfærslur,

4) „mikilvægisstig“: megindleg mörk eða lokapunktur sem rangfærslur, einar sér eða uppsafnaðar, þurfa að fara yfir til þess að sannprófandi telji þær verulegar,

5) „eðlislæg áhætta“: næmleiki mæliþáttar í losunarskýrslu fyrir rangfærslum sem gætu verið verulegar, einar sér eða uppsafnaðar, áður en tillit er tekið til áhrifa tengdrar eftirlitsstarfsemi,

6) „eftirlitsáhætta“: næmleiki mæliþáttar í losunarskýrslu fyrir rangfærslum sem gætu verið verulegar, einar sér eða uppsafnaðar með öðrum rangfærslum, sem ekki er hægt að koma í veg fyrir eða greina og leiðrétta tímanlega með eftirlitskerfinu,

7) „uppgötvunaráhætta”: sú áhætta að sannprófandi uppgötvi ekki verulegar rangfærslur,

8) „sannprófunaráhætta“: sú áhætta (sem er afleiðing af eðlislægri áhættu, eftirlitsáhættu og uppgötvunaráhættu), að sannprófandi láti frá sér óviðeigandi sannprófunarálit ef losunarskýrslan er ekki laus við verulegar rangfærslur,

9) „rangfærsla“: vanræksla, röng staðhæfing eða skekkja í uppgefnum gögnum, án tillits til þeirrar óvissu sem er leyfileg samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757 og með tilliti til viðmiðunarreglna framkvæmdastjórnarinnar um þetta málefni,

10) „veruleg rangfærsla“: rangfærsla sem, að mati sannprófandans, annaðhvort ein og sér eða uppsöfnuð með öðrum rangfærslum, vegur þyngra en mikilvægisstigið eða gæti á annan hátt haft áhrif á heildarlosun sem tilkynnt er um eða aðrar viðeigandi upplýsinga,

11) „vettvangur“: að því er varðar mat á eftirlitsáætluninni eða sannprófun á losunarskýrslu fyrir skip, staður þar sem vöktunarferlið er skilgreint og því stjórnað, þ.m.t. staðir þar sem eftirlit er haft með viðeigandi gögnum og upplýsingum og þau geymd,

12) „innri sannprófunargögn“: öll innri gögn sem sannprófandi hefur tekið saman til að skrá öll skrifleg sönnunargögn og rök fyrir starfsemi sem er innt af hendi við mat á eftirlitsáætluninni eða sannprófun á losunarskýrslu samkvæmt þessari reglugerð,

13) „úttektarmaður kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum“: einstaklingur í sannprófunarhóp sem ber ábyrgð á að meta vöktunaráætlun eða sannprófa losunarskýrslu,

14) „óháður rýnir“: einstaklingur, sem sannprófandi tilnefnir sérstaklega til að framkvæma innri endurskoðun, sem tilheyrir sama aðila en hefur ekki framkvæmt nein af þeim sannprófunarstörfum sem háð eru endurskoðun,

15) „tæknisérfræðingur“: einstaklingur sem lætur í té ítarlega þekkingu og sérþekkingu á tilteknu viðfangsefni sem þörf er á við framkvæmd sannprófunarstarfa að því er varðar II. kafla og við framkvæmd faggildingarstarfsemi að því er varðar IV. og V. kafla,

16) „matsmaður“: einstaklingur sem faggildingarstofa aðildarríkis hefur falið, einum og sér eða sem hluta af hóp, að annast mat á sannprófanda samkvæmt þessari reglugerð,

17) „yfirmatsmaður“: matsmaður sem hefur verið falið að bera heildarábyrgð á mati á sannprófanda samkvæmt þessari reglugerð.

3. gr.

Fyrirframætlað samræmi

Sannprófandi sem sýnir fram á að hann uppfylli viðmiðanirnar sem mælt er fyrir um í viðeigandi samhæfðum stöðlum, í skilningi 9. liðar 2. gr. reglugerðar (EB) nr. 765/2008, eða hlutum þeirra, og tilvísun í þá hefur verið birt í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*, skal teljast uppfylla þær kröfur sem settar eru fram í II. og III. kafla þessarar reglugerðar, að svo miklu leyti sem gildandi samhæfðir staðlar ná yfir þær kröfur.

II. KAFLI

SANNPRÓFUNARSTÖRF

1. HLUTI

Mat á vöktunaráætlunum

4. gr.

Upplýsingar sem fyrirtækjum ber að veita

1. Fyrirtæki skulu afhenda sannprófanda vöktunaráætlun skips síns og nota til þess sniðmát sem samsvarar fyrirmyndinni í I. viðauka við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2016/1927. Ef vöktunaráætlunin er á öðru tungumáli en ensku skulu þau leggja fram enska þýðingu.

2. Áður en mat á vöktunaráætluninni hefst skal fyrirtæki einnig afhenda sannprófandanum a.m.k. eftirfarandi upplýsingar:

a) viðeigandi gögn eða lýsingu á búnaði skipsins, þ.m.t. vottorð um upptök losunar, upplýsingar um flæðimæla, sem eru notaðir (ef við á), og aðferðir, ferla eða flæðirit sem eru útbúin og viðhaldið utan áætlunarinnar, ef við á, og vísað er til í áætluninni,

b) ef um er að ræða þær breytingar á vöktunar- og skýrslugjafarkerfinu sem um getur í c- og d-lið 2. mgr. 7. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 viðeigandi uppfærðar útgáfur eða ný gögn sem gera kleift að meta breyttu áætlunina.

3. Ef þess er óskað skal fyrirtækið leggja fram ýmsar aðrar upplýsingar sem teljast málinu viðkomandi svo framkvæma megi mat á áætluninni.

5. gr.

Mat á vöktunaráætlunum

1. Þegar sannprófandinn metur vöktunaráætlun skal hann sannprófa að hve miklu leyti upplýsingar, sem veittar eru í vöktunaráætluninni, standist kröfur fullyrðinga um heilleika, nákvæmni, mikilvægi og samræmi að því er varðar reglugerð (ESB) 2015/757.

2. Sannprófandi skal a.m.k.:

a) meta hvort fyrirtækið noti viðeigandi sniðmát fyrir vöktunaráætlun og að upplýsingar séu veittar um skyldubundnu atriðin sem um getur í I. viðauka við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2016/1927,

b) sannprófa að upplýsingarnar í vöktunaráætluninni lýsi, á heildstæðan og nákvæman hátt, upptökum losunar og mælibúnaði, sem er settur upp um borð í skipinu, og þeim kerfum og aðferðum sem eru fyrir hendi til að vakta og tilkynna viðeigandi upplýsingar samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757,

c) tryggja að viðunandi vöktunarfyrirkomulag sé fyrir hendi ef skip sækist eftir því að njóta góðs af undanþágunni frá vöktun eldsneytisnotkunar og losun koltvísýrings, „á grundvelli einstakra sjóferða“, skv. 2. mgr. 9. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757,

d) eftir atvikum, meta hvort upplýsingarnar, sem fyrirtækið leggur fram varðandi þætti, aðferðir eða eftirlit sem innleitt hefur verið sem hluti af fyrirliggjandi stjórnunarkerfi skipsins eða fellur undir staðla um viðeigandi samræmda gæða-, umhverfis- eða stjórnunarstaðla, varði vöktun á losun koltvísýrings og aðrar viðeigandi upplýsingar og skýrslugjöf samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757 og framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1928 ([1]).

3. Við mat á vöktunaráætluninni getur sannprófandinn nýtt sér fyrirspurnir, skjalaskoðun, athuganir og allar þær úttektaraðferðir sem telja má viðeigandi.

6. gr.

Vettvangsheimsóknir

1. Sannprófandi skal fara í vettvangsheimsóknir til að öðlast nægilegan skilning á þeim aðferðum sem lýst er í vöktunaráætluninni og sannprófa að tilheyrandi upplýsingar séu réttar.

2. Sannprófandinn skal ákvarða einn eða fleiri staði fyrir vettvangsheimsóknirnar, að teknu tilliti til geymslustaðar flestra af mikilvægustu upplýsingunum sem málið varðar, þ.m.t. rafræn eða prentuð afrit af frumritum sem geymd eru um borð í skipinu, og staðinn þar sem gagnaflæðisaðgerðir eru framkvæmdar.

3. Sannprófandinn skal einnig ákvarða hvaða störf eigi að framkvæma og hversu löng vettvangsheimsóknin þarf að vera.

([1]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1928 frá 4. nóvember 2016 um ákvörðun á farmi sem er fluttur um borð í öðrum flokkum skipa en farþegaskipum, ekjuskipum og gámaskipum samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum (Stjtíð. ESB L 299, 5.11.2016, bls. 22).

4. Þrátt fyrir 1. mgr. er sannprófanda heimilt að sleppa vettvangsheimsókn, að því tilskildu að eitt af eftirfarandi skilyrðum sé uppfyllt:

a) hann hefur nægjanlegan skilning á vöktunar- og skýrslugjafarkerfum skipsins, þ.m.t. að þau séu fyrir hendi, og að fyrirtækið hafi hrint þeim í framkvæmd og reki þau á skilvirkan hátt,

b) eðli vöktunar- og skýrslugjafarkerfis skipsins og margbreytileiki þess er þannig að ekki er þörf á vettvangsheimsókn,

c) sannprófandinn getur aflað allra tilskilinna upplýsinga og metið þær úr fjarlægð.

5. Ef sannprófandinn sleppir því að fara í vettvangsheimsókn, í samræmi við 4. mgr., skal hann leggja fram rök í innri sannprófunargögnunum fyrir því að fara ekki í heimsóknina.

7. gr.

Tekið á ósamræmi í vöktunaráætlun

1. Þegar sannprófandi finnur ósamræmi við mat á vöktunaráætlun skal hann tilkynna fyrirtækinu um það, án ótilhlýðilegrar tafar, og krefjast þess að viðeigandi leiðréttingar séu gerðar innan þess tímaramma sem hann leggur til.

2. Fyrirtækið skal leiðrétta allt ósamræmi sem sannprófandinn tilkynnir um og leggja endurskoðaða vöktunaráætlun fyrir sannprófandann innan þess tímaramma sem þeir hafa komið sér saman um, sem gerir sannprófandanum kleift að endurmeta hana áður en skýrslutímabilið hefst.

3. Sannprófandinn skal skrá allt ósamræmi, sem hefur verið leiðrétt við mat á vöktunaráætluninni, í innri sannprófunargögnin og merkja það sem leiðrétt.

8. gr.

Óháð endurskoðun á mati á vöktunaráætlun

1. Sannprófunarhópurinn skal leggja innri sannprófunargögnin og drög að niðurstöðum matsins á áætluninni fyrir tilnefndan óháðan rýni, tafarlaust og áður en hann tilkynnir fyrirtækinu um þau.

2. Óháði rýnirinn skal framkvæma endurskoðun til að tryggja að vöktunaráætlunin hafi verið metin í samræmi við þessa reglugerð og að tilhlýðileg fagleg gaumgæfni og dómgreind hafi verið viðhöfð.

3. Umfang óháðu endurskoðunarinnar skal ná yfir allt matsferlið sem lýst er í þessum hluta og skal fellt inn í innri sannprófunargögnin.

4. Sannprófandinn skal fella niðurstöðurnar úr óháðu endurskoðuninni inn í innri sannprófunargögnin.

9. gr.

Niðurstöður sannprófanda úr matinu á vöktunaráætluninni

Sannprófandinn skal, á grunni upplýsinganna sem er safnað meðan á mati á vöktunaráætlun stendur, tilkynna fyrirtækinu skriflega og án tafar um niðurstöðurnar sem hann komst að og gefa til kynna hvort vöktunaráætlunin:

a) hafi verið metin í samræmi við reglugerð (ESB) 2015/757,

b) feli í sér ósamræmi sem geri það að verkum að hún samrýmist ekki reglugerð (ESB) 2015/757.

2. HLUTI

Sannprófun losunarskýrslna

10. gr.

Upplýsingar sem fyrirtæki eiga að veita

1. Áður en sannprófun á losunarskýrslu hefst skulu fyrirtækin afhenda sannprófandanum eftirfarandi upplýsingar:

a) skrá yfir sjóferðir viðkomandi skips á skýrslutímabilinu, skv. 10. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757,

b) afrit af losunarskýrslunni frá næstliðnu ári, ef við á, ef sannprófandinn framkvæmdi ekki sannprófunina fyrir þá skýrslu,

c) afrit af vöktunaráætluninni eða -áætlununum, sem voru notaðar, þ.m.t. rökstuðningur fyrir niðurstöðunum úr matinu sem unnið var af faggiltum sannprófanda, ef við á.

2. Þegar sannprófandi hefur tilgreint einn eða fleiri hluta eða eitt eða fleiri skjöl sem talin eru viðeigandi að því er varðar sannprófunina skulu fyrirtækin einnig leggja fram eftirfarandi stoðupplýsingar:

a) afrit af opinberri dagbók skipsins og olíudagbók þess (ef þær eru aðskildar),

b) afrit af skjölum sem varða eldsneytistöku,

c) afrit af skjölum sem innihalda upplýsingar um fjölda farþega sem voru fluttir og magn farms sem var fluttur, vegalengd sem var farin og úthaldstíma á sjó að því er varðar ferðir skipsins á skýrslutímabilinu.

3. Sannprófendur mega, þar að auki, óska eftir að fyrirtækið leggi fram, ef við á og á grunni vöktunaraðferðarinnar sem er notuð:

a) yfirlit yfir upplýsingatækniumhverfið sem sýnir gagnaflæðið fyrir skipið sem um ræðir,

b) gögn um viðhald og mælinákvæmni/-óvissu búnaðar/flæðimæla (t.d. kvörðunarvottorð),

c) útdrátt úr aðgerðaskrám flæðimæla fyrir eldsneytisnotkun,

d) afrit gagna um aflestrartölur mæla í eldsneytistönkum,

e) útdrátt úr aðgerðaskrám mælikerfa fyrir beina losun,

f) allar aðrar viðeigandi upplýsingar sem varða sannprófun losunarskýrslu.

4. Ef skipt er um fyrirtæki skulu hlutaðeigandi fyrirtæki sýna tilhlýðilega kostgæfni við að útvega sannprófandanum framangreind fylgiskjöl eða upplýsingar sem varða sjóferðir sem farnar eru innan hvers og eins ábyrgðarsviðs þeirra.

5. Fyrirtæki skulu geyma framangreindar upplýsingar í þau tímabil sem ákveðin voru í alþjóðasamningnum frá 1973 um varnir gegn mengun frá skipum (MARPOL-samningnum) og alþjóðasamningnum frá 1988 um öryggi mannslífa á hafinu (SOLAS-samþykktinni). Sannprófandinn getur, fram að útgáfu samræmingarskjalsins í samræmi við 17. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, óskað eftir öllum þeim upplýsingum sem um getur í 1., 2. og 3. mgr.

11. gr.

Áhættumat sem sannprófendur eiga að framkvæma

1. Auk þáttanna, sem um getur í 1., 2. og 3. mgr. 15. gr. í reglugerð (ESB) 2015/757, skal sannprófandi auðkenna og greina alla eftirfarandi þætti:

a) eðlislæga áhættu,

b) eftirlitsáhættu,

c) uppgötvunaráhættu.

2. Sannprófandi skal taka tillit til svæða þar sem er aukin sannprófunaráhætta og a.m.k. eftirfarandi: siglingagagna, eldsneytisnotkunar, losunar koltvísýrings, vegalengdar sem farin er, úthaldstíma á sjó, farms sem er fluttur og uppsafnaðra gagna í losunarskýrslunni.

3. Þegar sannprófandi auðkennir og greinir þá þætti sem um getur í 2. mgr. skal hann sannprófa hvort tilkynntar upplýsingar séu fyrir hendi og hvort þær séu heillegar, nákvæmar, samræmdar, gagnsæjar og mikilvægar.

4. Í ljósi upplýsinga, sem aflað er meðan á sannprófun stendur, skal sannprófandi, eftir því sem við á, endurskoða áhættugreininguna og breyta eða endurtaka sannprófunarstarfsemina sem á að fara fram.

12. gr.

Sannprófunaráætlun

Sannprófandi skal gera drög að sannprófunaráætlun í réttu samræmi við þær upplýsingar sem hann hefur aflað sér og þá áhættu sem hann hefur greint meðan á áhættugreiningu stóð. Sannprófunaráætlunin skal a.m.k. innihalda:

a) sannprófunarskipulagsáætlun þar sem eðli og umfangi sannprófunarstarfanna er lýst sem og með hvaða hætti og á hve löngum tíma þau verða innt af hendi,

b) gagnasöfnunaráætlun þar sem greint er frá umfangi og aðferðum við gagnasöfnun sem varða þá gagnapunkta sem liggja að baki uppsafnaðra gagna um losun koltvísýrings, eldsneytisnotkun eða aðrar upplýsingar í losunarskýrslunni.

13. gr.

Sannprófunarstörf sem varða losunarskýrsluna

1. Sannprófandi skal framkvæma sannprófunaráætlunina og, á grunni áhættumatsins, sannprófa hvort vöktunar- og skýrslugjafarkerfin, eins og þeim er lýst í vöktunaráætluninni sem metin hefur verið sem viðunandi, séu fyrir hendi í reynd og séu framkvæmd á tilhlýðilegan hátt.

Í því skyni skal sannprófandinn íhuga að framkvæma a.m.k. eftirfarandi tegundir aðgerða:

a) fyrirspurnir til viðeigandi starfsmanna,

b) skjalaskoðun,

c) aðferðir við athugun og yfirferð kerfa (e. *walkthrough procedure*).

2. Ef við á skal sannprófandi athuga hvort innri eftirlitsstarfsemi sem lýst er í vöktunaráætluninni sé framkvæmd á skilvirkan hátt. Í því skyni getur hann íhugað að prófa skilvirkni skráðs eftirlits á grunni sýnis.

14. gr.

Sannprófun uppgefinna gagna

1. Sannprófandi skal sannprófa uppgefin gögn í losunarskýrslunni með ítarlegum prófunum, þ.m.t. með því að rekja gögnin aftur til upprunalegu gagnalindarinnar, bera gögn saman við utanaðkomandi gagnalindir, þ.m.t. gögn um fjarvöktun skipa, framkvæma afstemmingar, athuga viðmiðunarmörk varðandi viðeigandi gögn og framkvæma endurútreikninga.

2. Sannprófandi skal, sem hluti af sannprófun gagnanna, sem um getur í 1. mgr., athuga eftirfarandi:

a) heilleika í tengslum við losunarupptök eins og lýst í vöktunaráætluninni,

b) heilleika gagna, þ.m.t. um sjóferðir, sem tilkynnt eru í samræmi við reglugerð (ESB) 2015/757,

c) samkvæmni milli uppgefinna uppsafnaðra gagna og gagna úr viðeigandi skjölum eða frumheimildum,

d) samkvæmni milli uppsafnaðrar eldsneytisnotkunar og gagna um eldsneyti sem er keypt eða útvegað á annan hátt fyrir umrætt skip, ef við á,

e) áreiðanleika og nákvæmni gagnanna.

15. gr.

Mikilvægisstig

1. Til að sannprófa gögn um eldsneytisnotkun og um losun koltvísýrings í losunarskýrslunni skal mikilvægisstigið vera 5% af samanlögðu heildargildi sem er gefið upp fyrir hvort atriði fyrir sig á skýrslutímabilinu.

2. Til að sannprófa aðrar upplýsingar sem máli skipta í losunarskýrslunni, um farm sem var fluttur, flutningastarfsemi, vegalengd sem var farin og úthaldstíma á sjó, skal mikilvægisstigið vera 5% af samanlögðu heildargildi sem er gefið upp fyrir hvert atriði fyrir sig á skýrslutímabilinu.

16. gr.

Vettvangsheimsóknir

1. Sannprófandi skal fara í vettvangsheimsóknir til að öðlast nægilegan skilning á fyrirtækinu og vöktunar- og skýrslugjafarkerfi skipsins eins og því er lýst í vöktunaráætluninni.

2. Sannprófandinn skal ákvarða einn eða fleiri staði fyrir vettvangsheimsóknirnar á grunni niðurstöðu áhættumatsins og að teknu tilliti til geymslustaðar flestra af mikilvægustu upplýsingunum sem málið varðar, þ.m.t. rafræn eða prentuð afrit af frumritum sem geymd eru um borð í skipinu, og staðinn þar sem gagnaflæðisaðgerðir eru framkvæmdar.

3. Sannprófandinn skal einnig ákvarða hvaða störf eigi að framkvæma og hversu löng vettvangsheimsóknin þarf að vera.

4. Þrátt fyrir 1. mgr. er sannprófanda heimilt að sleppa vettvangsheimsókn, að því tilskildu að eitt af eftirfarandi skilyrðum sé uppfyllt á grunni niðurstöðu áhættumatsins:

a) hann hefur nægjanlegan skilning á vöktunar- og skýrslugjafarkerfum skipsins, þ.m.t. að þau séu fyrir hendi, og að fyrirtækið hafi hrint þeim í framkvæmd og reki þau á skilvirkan hátt,

b) eðli vöktunar- og skýrslugjafarkerfis skipsins og margbreytileiki þess er þannig að ekki er þörf á vettvangsheimsókn,

c) hann getur aflað allra tilskilinna upplýsinga og metið þær úr fjarlægð, þ.m.t. athugað hvort vöktunaraðferðin, sem lýst er í vöktunaráætluninni, sé notuð á réttan hátt og sannprófað gögnin sem gefin eru upp í losunarskýrslunni.

5. Ef í ljós kemur á grunni niðurstöðu úr vettvangsheimsókn til tiltekins staðar á landi að nauðsynlegt sé að fara um borð í skip, til að draga úr hættu á verulegum rangfærslum í losunarskýrslunni, er sannprófanda heimilt að ákveða að fara um borð í viðkomandi skip.

6. Ef sannprófandi sleppir því að fara í vettvangsheimsókn, í samræmi við 4. mgr., skal hann leggja fram rök fyrir þeirri ákvörðun sinni í innri sannprófunargögnunum.

17. gr.

Tekið á rangfærslum og ósamræmi í losunarskýrslu

1. Þegar sannprófandinn finnur rangfærslur eða ósamræmi við sannprófun á losunarskýrslunni skal hann tilkynna fyrirtækinu um það, án ótilhlýðilegrar tafar, og krefjast þess að viðeigandi leiðréttingar séu gerðar innan hæfilegs frests.

2. Sannprófandinn skal skrá allar rangfærslur og ósamræmi, sem hafa verið leiðrétt við sannprófunina, í innri sannprófunargögnin og merkja þau sem leiðrétt.

3. Ef fyrirtækið leiðréttir hvorki rangfærslurnar né ósamræmið, sem um getur í 1. mgr., skal sannprófandinn, áður en hann gefur út sannprófunarskýrsluna, fara fram á það við fyrirtækið að það útskýri helstu orsakir rangfærslnanna eða ósamræmisins.

4. Sannprófandi skal ákvarða hvort óleiðréttu rangfærslurnar, einar og sér eða ásamt öðrum rangfærslum, hafi áhrif á uppgefna heildarlosun eða aðrar viðeigandi upplýsingar og hvort áhrifin skapi verulegar rangfærslur.

5. Sannprófanda er heimilt að líta svo á að rangfærslur eða ósamræmi, sem eitt og sér eða ásamt öðrum rangfærslum liggja fyrir neðan mikilvægisstigið sem er fastsett í 15. gr., feli í sér verulegar rangfærslur þegar slíkt er rökstutt af umfangi þeirra og eðli eða af þeim sérstöku aðstæðum þar sem þær koma fyrir.

18. gr.

Niðurstaða sannprófunar á losunarskýrslu

Til að ljúka sannprófun á losunarskýrslu skal sannprófandi hið minnsta:

a) staðfesta að öll sannprófunarstörf hafi verið innt af hendi,

b) framkvæma síðustu greiningarferli á uppsöfnuðu gögnunum til að tryggja að í þeim séu engar verulegar rangfærslur,

c) sannprófa hvort upplýsingarnar í skýrslunni uppfylla kröfurnar í reglugerð (ESB) 2015/757,

d) útbúa, áður en hann gefur út skýrsluna, innri sannprófunargögnin og uppkastið að skýrslunni og leggja þau fyrir óháða rýninn í samræmi við 21. gr.,

e) heimila einstaklingi að staðfesta skýrsluna á grunni niðurstaðna óháða rýnisins og vísbendinga í innri sannprófunargögnunum og tilkynna fyrirtækinu um það,

f) tilkynna framkvæmdastjórninni og fánaríki skipsins um það hvort skilyrði fyrir útgáfu samræmingarskjalsins séu uppfyllt.

19. gr.

Tillögur um umbætur

1. Sannprófandi skal tilkynna fyrirtækinu um tilmæli til úrbóta í tengslum við óleiðréttar rangfærslur og ósamræmi sem hafa ekki í för með sér verulegar rangfærslur.

2. Sannprófanda er heimilt að tilkynna um önnur tilmæli til úrbóta sem honum þykja viðeigandi í ljósi niðurstöðu sannprófunarstarfanna.

3. Þegar hann tilkynnir fyrirtækinu um tilmæli sín skal sannprófandinn sýna óhlutdrægni gagnvart fyrirtækinu, skipinu og vöktunar- og skýrslugjafarkerfinu. Hann skal ekki tefla óhlutdrægni sinni í tvísýnu með því að veita ráðleggingar eða með því að þróa hluta af vöktunar- og skýrslugjafarferlinu samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757.

20. gr.

Sannprófunarskýrsla

1. Sannprófandi skal, á grunni þeirra upplýsinga sem safnað er, gefa út sannprófunarskýrslu fyrir fyrirtækið vegna hverrar losunarskýrslu sem sannprófuð er.

2. Sannprófunarskýrslan skal innihalda yfirlýsingu sem staðfestir að losunarskýrslan sé viðunandi, eða óviðunandi ef hún inniheldur verulegar rangfærslur sem ekki voru leiðréttar áður en skýrslan var gefin út.

3. Að því er varðar 2. mgr. skal einungis líta svo á að staðfest hafi verið að losunarskýrslan sé viðunandi ef hún er laus við verulegar rangfærslur.

4. Sannprófunarskýrslan skal a.m.k. innihalda eftirfarandi þætti:

a) heiti fyrirtækisins og auðkenningu skipsins,

b) titil þar sem skýrt kemur fram að um sannprófunarskýrslu sé að ræða,

c) auðkenni sannprófandans,

d) vísun í losunarskýrsluna og það skýrslutímabil sem var til sannprófunar,

e) vísun í eina eða fleiri vöktunaráætlun sem hefur verið metin sem viðunandi,

f) vísun í sannprófunarstaðalinn eða -staðlana sem stuðst var við,

g) samantekt á aðferðum sannprófandans, þ.m.t. upplýsingar um vettvangsheimsóknir eða ástæðurnar fyrir því að þeim var sleppt,

h) samantekt á umtalsverðum breytingum á vöktunaráætluninni og aðgerðarskrám á skýrslutímabilinu, ef við á,

i) sannprófunaryfirlýsingu,

j) lýsingu á óleiðréttum rangfærslum og ósamræmi, þ.m.t. eðli þeirra og umfang, hvort sem þær hafa veruleg áhrif eða ekki, og þann þátt eða þætti losunarskýrslunnar sem þau tengjast, ef um slíkt er að ræða,

k) eftir atvikum, tillögur að úrbótum,

l) dagsetningu sannprófunarskýrslunnar og undirskrift einstaklings, sem hefur til þess leyfi, fyrir hönd sannprófandans.

21. gr.

Óháð endurskoðun á losunarskýrslu

1. Óháði rýnirinn skal endurskoða innri sannprófunarskjölin og uppkastið að skýrslunni til að staðfesta að farið hafi verið í gegnum sannprófunarferlið í samræmi við þessa reglugerð og að tilhlýðilegri faglegri gaumgæfni og dómgreind hafi verið beitt.

2. Umfang óháðu endurskoðunarinnar skal ná yfir allt sannprófunarferlið, sem mælt er fyrir um í þessum hluta, og fellt inn í innri sannprófunargögnin.

3. Að lokinni staðfestingu á losunarskýrslunni, samkvæmt e-lið 18. gr., skal sannprófandinn láta niðurstöður úr óháðu endurskoðuninni fylgja með innri sannprófunargögnunum.

III. KAFLI

KRÖFUR SEM VARÐA SANNPRÓFENDUR

22. gr.

Stöðugt hæfnisferli

1. Sannprófandi skal koma á fót, skjalfesta, framkvæma og viðhalda stöðugu hæfnisferli til þess að tryggja að allt starfsfólk, sem falið er að sinna sannprófunarstörfum, sé hæft til að sinna þeim verkefnum sem því eru falin.

2. Að því er varðar hæfnisferlið, sem um getur í 1. mgr., skal sannprófandinn koma á fót, skjalfesta, framkvæma og viðhalda eftirfarandi:

a) almennum hæfnisviðmiðunum fyrir allt starfsfólk sem fæst við sannprófunarstörf í samræmi við 3. mgr. 23. gr.,

b) sérstökum hæfnisviðmiðunum fyrir hvert verk sannprófanda sem tekur að sér sannprófunarstörf, einkum fyrir úttektarmann kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum, óháða rýninn og tæknisérfræðinginn, í samræmi við 24., 25. og 26. gr.,

c) aðferð til að tryggja stöðuga hæfni og reglulegt mat á frammistöðu alls starfsfólks sem fæst við sannprófunarstörf,

d) ferli til að tryggja reglubundna þjálfun starfsfólks sem fæst við sannprófunarstörf.

3. Sannprófandi skal með reglulegu millibili, a.m.k. árlega, vakta frammistöðu alls starfsfólks, sem annast sannprófunarstörf, til að staðfesta stöðuga hæfni þess.

23. gr.

Sannprófunarhópar

1. Fyrir sérhvert sannprófunarverkefni skal sannprófandi setja saman sannprófunarhóp sem er fær um að sinna sannprófunarstörfunum sem um getur í 5.–20. gr.

2. Sannprófunarhópurinn skal settur saman úr a.m.k. einum úttektarmanni kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum og, eftir því sem við á, í ljósi skilnings sannprófandans á því hversu flókin þau verkefni sem á að framkvæma eru og getu hans til að framkvæma hið nauðsynlega áhættumat, hæfilegum fjölda annarra úttektarmanna kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum og/eða tæknisérfræðingum.

3. Aðilar að hópnum skulu hafa skýran skilning á hinu sérstaka hlutverki sínu í sannprófunarferlinu og skulu vera færir um að eiga markviss samskipti á því tungumáli sem þarf til að framkvæma sannprófunarverkefni sín og til að skoða þær upplýsingar sem fyrirtækið leggur fram.

24. gr.

Kröfur um hæfni úttektarmanna kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum

1. Úttektarmenn kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum skulu hafa þá hæfni sem þarf til að meta vöktunaráætlanir og sannprófa losunarskýrslur í samræmi við reglugerð (ESB) 2015/757 og þessa reglugerð.

2. Í þessu skyni skulu úttektarmenn kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum a.m.k. búa yfir:

a) þekkingu á reglugerð (ESB) 2015/757, þessari reglugerð, framkvæmdarreglugerð (ESB) 2016/1927, framkvæmdarreglugerð (ESB) 2016/1928 og viðeigandi viðmiðunarreglum sem framkvæmdastjórnin gefur út,

b) þekkingu og reynslu af úttekt á gögnum og upplýsingum, þ.m.t.:

i. aðferðum við úttekt á gögnum og upplýsingum, beitingu mikilvægisstigs og mati á því hversu verulegar rangfærslur eru,

ii. greiningu á eðlislægri áhættu og eftirlitsáhættu,

iii. úrtökuaðferðum í tengslum við gagnasöfnun og athugun á eftirlitsstarfsemi,

iv. mati á gagna- og upplýsingakerfum, upplýsingatæknikerfum, starfsemi í tengslum við gagnaflæði, eftirlitsstarfsemi, eftirlitskerfum og aðferðum vegna eftirlitsstarfsemi.

3. Þar að auki skal taka tillit til þekkingar, sem er bundin við geirann, og reynslu af viðeigandi þáttum eins og tilgreint er í viðaukanum.

25. gr.

Hæfniskröfur um óháða rýna

1. Óháður rýnir skal uppfylla þær hæfniskröfur fyrir úttektarmann kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum sem um getur í 24. gr.

2. Til að meta heilleika innri sannprófunargagnanna og hvort nægum vísbendingum hafi verið safnað meðan á sannprófunarstörfum stóð skal óháði rýnirinn hafa nægjanlega hæfni til að:

a) greina þær upplýsingar sem lagðar eru fram og staðfesta heilleika þeirra og heildstæði,

b) véfengja upplýsingar sem vantar eða eru mótsagnakenndar,

c) skoða gagnaslóðir til að meta hvort innri sannprófunargögnin veiti fullnægjandi upplýsingar til stuðnings drögunum að niðurstöðunum sem athugaðar eru í innri endurskoðuninni.

26. gr.

Notkun tæknisérfræðinga

1. Þegar þörf er á ítarlegri þekkingu og sérþekkingu við sannprófunarstörf eða endurskoðunarferlið er úttektarmanni kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í sjóflutningum eða óháðum rýni heimilt að notast við tæknisérfræðinga sem vinna undir þeirra leiðsögn og á ábyrgð þeirra.

2. Auk þekkingar á hinu sértæka viðfangsefni skulu tæknisérfræðingar hafa nægjanlegan skilning á þeim atriðum sem um getur í 24. gr.

27. gr.

Aðferðir við sannprófunarstörf

1. Sannprófendur skulu koma á fót, skjalfesta, framkvæma og viðhalda einni eða fleiri aðferðum og ferlum fyrir sannprófunarstörfin sem lýst er í 5.–21. gr.

2. Þegar sannprófandi kemur á fót og framkvæmir slíkar aðferðir og ferla skal hann útfæra starfsemina í samræmi við samhæfða staðalinn samkvæmt reglugerð (EB) nr. 765/2008 um kröfur varðandi fullgildingar- og sannprófunaraðila í tengslum við gróðurhúsalofttegundir til notkunar við faggildingu eða annars konar viðurkenningu.

3. Sannprófendur skulu hanna, skjalfesta, hrinda í framkvæmd og viðhalda gæðastjórnunarkerfi til þess að tryggja samræmda þróun, framkvæmd, úrbætur og endurskoðun á aðferðum og ferlum í samræmi við samhæfða staðalinn sem um getur í 2. mgr.

4. Að auki skulu sannprófendur koma á fót eftirfarandi aðferðum, ferlum og fyrirkomulagi í samræmi við samhæfða staðalinn sem um getur í 2. mgr.:

a) ferli og stefnu varðandi samskipti við fyrirtækið,

b) fullnægjandi ráðstöfunum til að tryggja að upplýsingar, sem aflað er, séu trúnaðarmál,

c) ferli til að bregðast við áfrýjunum fyrirtækja,

d) ferli til að bregðast við kvörtunum fyrirtækja (þ.m.t. leiðbeinandi tímaáætlun),

e) ferli vegna útgáfu endurskoðaðrar sannprófunarskýrslu þegar villa í sannprófunarskýrslu eða losunarskýrslu finnst eftir að sannprófandinn hefur lagt sannprófunarskýrsluna fyrir fyrirtækið.

28. gr.

Innri sannprófunargögn

1. Sannprófandi skal undirbúa og taka saman innri sannprófunargögn sem innihalda a.m.k.:

a) niðurstöður þeirra sannprófunarstarfa sem unnin hafa verið,

b) sannprófunaráætlun og áhættumat,

c) nægjanlegar upplýsingar til að styðja við mat á vöktunaráætluninni og á drögum að sannprófunarskýrslunni, þ.m.t. rök fyrir úrskurði um það hvort rangfærslur voru verulegar eða ekki.

2. Gerð draga að innri sannprófunargögnum skal vera með þeim hætt að óháði rýnirinn, sem um getur í 8. og 21. gr., og faggildingarstofa aðildarríkis geti metið hvort sannprófunin hafi farið fram í samræmi við þessa reglugerð.

29. gr.

Skrár og boðskipti

1. Sannprófendur skulu halda skrár, þ.m.t. skrár um hæfni og óhlutdrægni starfsfólks síns, til þess að sýna fram á að farið sé að ákvæðum þessarar reglugerðar.

2. Sannprófendur skulu tryggja að upplýsingar, sem aflað er meðan á sannprófun stendur, í samræmi við samhæfða staðalinn sem um getur í 27. gr., séu trúnaðarmál.

30. gr.

Óhlutdrægni og óhæði

1. Sannprófendur skulu vera skipulagðir á þann hátt að þeir standi vörð um hlutlægni sína, óhæði og óhlutdrægni. Að því er varðar þessa reglugerð gilda viðeigandi kröfur sem mælt er fyrir um í samhæfða staðlinum sem um getur í 27. gr.

2. Sannprófendur skulu ekki annast sannprófunarstörf fyrir fyrirtæki ef það felur í sér óæskilega áhættu fyrir óhlutdrægni þeirra eða veldur hagsmunaárekstrum.

3. Óæskileg áhætta gagnvart óhlutdrægni eða hagsmunaárekstrar teljast m.a. koma upp ef sannprófandi eða einhver aðili sem tilheyrir sama lögaðila eða hópi starfsfólks og verktökum sem koma að sannprófun, veitir:

a) ráðgjafarþjónustu til að þróa hluta af vöktunar- og skýrslugjafarferlinu, sem lýst er í vöktunaráætluninni, þ.m.t. að þróa aðferð við vöktun, gera drög að losunarskýrslu og drög að vöktunaráætlun,

b) tækniaðstoð til að þróa eða viðhalda kerfi sem komið var á til að vakta og gefa skýrslur um losun eða aðrar upplýsingar sem máli skipta samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757.

4. Sannprófendur skulu ekki útvista óháðu endurskoðuninni eða útgáfu sannprófunarskýrslunnar.

5. Ef sannprófendur útvista öðrum sannprófunarstörfum ættu þeir að uppfylla viðeigandi kröfur sem mælt er fyrir um í samhæfða staðlinum sem um getur í 27. gr.

6. Sannprófendur skulu koma á, skjalfesta, hrinda í framkvæmd og viðhalda ferli til að tryggja óhlutdrægni og óhæði sína við sannprófun sem og annarra aðila sem tilheyra sama lögaðila og alls starfsfólks. Ef um útvistun er að ræða gilda sömu skyldur um verktaka sem koma að sannprófuninni. Það ferli skal uppfylla viðeigandi kröfur sem mælt er fyrir um í samhæfða staðlinum sem um getur í 27. gr.

IV. KAFLI

FAGGILDING SANNPRÓFENDA

31. gr.

Gildissvið faggildingar

Gildissvið faggildingar sannprófenda skal ná til mats á vöktunaráætlunum og sannprófunar á losunarskýrslum.

32. gr.

Markmið með faggildingarferli

Meðan á faggildingarferli og árlegu eftirliti með faggiltum sannprófendum stendur, í samræmi við 36.–41. gr., skulu faggildingarstofur aðildarríkjanna meta hvort sannprófandinn og starfsfólk hans sem annast sannprófunarstörf:

a) búi yfir þeirri hæfni sem þarf til að meta vöktunaráætlanir og sannprófa losunarskýrslur í samræmi við þessa reglugerð,

b) meti í raun vöktunaráætlanir og sannprófi losunarskýrslur í samræmi við þessa reglugerð,

c) uppfylli kröfurnar varðandi sannprófendur, sem um getur í 22.–30. gr., þ.m.t. þær sem varða óhlutdrægni og óhæði.

33. gr.

Lágmarkskröfur um faggildingu

Að því er varðar lágmarkskröfur um faggildingu og kröfur um faggildingarstofur gildir samhæfði staðallinn samkvæmt reglugerð (EB) nr. 765/2008 varðandi almennar kröfur um faggildingarstofur sem faggilda samræmismatsstofur.

34. gr.

Viðmiðanir um faggildingu sem beint er til faggildingarstofu aðildarríkja

1. Lögaðilar með staðfestu í aðildarríki skulu óska eftir faggildingu í samræmi við 7. gr. reglugerðar (ESB) nr. 765/2008.

2. Ef lögaðili sem óskar eftir faggildingu hefur ekki staðfestu í aðildarríki er honum heimilt að beina beiðni sinni til faggildingarstofu í einhverju aðildarríki sem veitir faggildingu í skilningi 16. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757.

35. gr.

Beiðnir um faggildingu

1. Beiðnir um faggildingu skulu innihalda þær upplýsingar sem krafist er á grundvelli samhæfða staðalsins sem um getur í 33. gr.

2. Áður en matið, sem um getur í 36. gr., hefst skulu umsækjendur, sé þess óskað, þar að auki veita faggildingarstofu aðildarríkisins aðgang að upplýsingum um:

a) aðferðirnar og ferlin, sem um getur í 1. mgr. 27. gr., og um gæðastjórnunarkerfið sem um getur í 3. mgr. 27. gr.,

b) hæfnisviðmiðanirnar, sem um getur í a- og b-lið 2. mgr. 22. gr., niðurstöður úr samfellda hæfnisferlinu, sem um getur í þeirri grein, og önnur viðeigandi gögn um hæfni alls starfsfólksins sem tekur þátt í sannprófunarstörfunum sem um getur í 24. og 25. gr.,

c) ferli til að tryggja áframhaldandi óhlutdrægni og óhæði, eins og um getur í 6. mgr. 30. gr.,

d) tæknisérfræðinga og lykilstarfsfólk sem kemur að mati á vöktunaráætlunum og sannprófunum á losunarskýrslum,

e) aðferðir og ferla sem notuð eru til að tryggja viðeigandi sannprófun, þ.m.t. þau sem varða innri sannprófunargögnin sem um getur í 28. gr.,

f) viðeigandi skrár, eins og um getur í 29. gr.,

g) aðra þætti sem faggildingarstofa aðildarríkisins telur skipta máli.

36. gr.

Mat

1. Að því er varðar matið, sem um getur í 32. gr., skal matshópurinn a.m.k.:

a) fara yfir öll viðeigandi gögn og skrár sem umsækjandinn leggur fram skv. 35. gr.,

b) fara í vettvangsheimsókn til að fara yfir dæmigert úrtak úr innri sannprófunargögnum og meta framkvæmd gæðastjórnunarkerfis umsækjanda sem og aðferðirnar eða ferlin við sannprófunarstörfin sem um getur í 27. gr.,

c) fylgjast með framkvæmd og hæfni dæmigerðs fjölda starfsfólks umsækjanda, sem tekur þátt í mati á vöktunaráætlunum og sannprófun á losunarskýrslum, til þess að tryggja að starfsfólkið starfi í samræmi við þessa reglugerð.

2. Matshópurinn skal sinna þeim störfum sem lýst er í 1. mgr. í samræmi við kröfurnar í samhæfða staðlinum sem um getur í 33. gr.

3. Matshópurinn skal kynna umsækjandanum niðurstöður sínar og hvers konar ósamræmi, og óska eftir viðbrögðum frá honum í samræmi við kröfur samhæfða staðalsins sem um getur í 33. gr.

4. Umsækjandi skal grípa til aðgerða til úrbóta til að bregðast við hvers konar ósamræmi, sem honum er tilkynnt um skv. 3. mgr., og skal hann tilgreina í svari sínu hvaða ráðstafanir hann hafi gert eða fyrirhugar að gera til að ráða bót á ósamræminu innan þeirra tímamarka sem faggildingarstofa aðildarríkisins ákvarðar.

5. Faggildingarstofa aðildarríkisins skal fara yfir svarið sem umsækjandi leggur fram skv. 4. mgr.

6. Ef faggildingarstofa aðildarríkisins álítur svör umsækjanda eða þá aðgerð sem hann hefur gripið til ófullnægjandi eða óskilvirka skal hún krefja umsækjanda um frekari upplýsingar eða að hann grípi til frekari aðgerða.

7. Faggildingarstofa aðildarríkisins getur einnig óskað eftir vísbendingum sem færa sönnur á að gripið hafi verið til aðgerðar til úrbóta eða framkvæmt mat á eftirfylgni til að meta hana.

37. gr.

Ákvörðun um faggildingu og faggildingarvottorð

1. Faggildingarstofa aðildarríkis skal taka tillit til krafnanna í samhæfða staðlinum, sem um getur í 33. gr., við undirbúning og ákvarðanatöku varðandi það hvort hún veiti umsækjanda faggildingu og hvort hún framlengi hana eða endurnýi.

2. Þegar faggildingarstofa aðildarríkis hefur ákveðið að veita umsækjanda faggildingu eða endurnýja hana skal hún gefa út faggildingarvottorð þess efnis.

3. Faggildingarvottorðið skal a.m.k. innihalda þær upplýsingar sem krafist er á grundvelli samhæfða staðalsins sem um getur 33. gr.

4. Faggildingarvottorðið skal gilda í fimm ár frá útgáfudegi þess.

38. gr.

Árlegt eftirlit

1. Faggildingarstofa aðildarríkis skal framkvæma árlegt eftirlit með hverjum þeim sannprófanda sem hún hefur gefið út faggildingarvottorð fyrir. Það eftirlit skal a.m.k. fela í sér:

a) vettvangsheimsókn eins og um getur í b-lið 1. mgr. 36. gr.,

b) að fylgst sé með frammistöðu og hæfni dæmigerðs fjölda starfsfólks sannprófanda í samræmi við c-lið 1. mgr. 36. gr.

2. Faggildingarstofa aðildarríkis skal framkvæma fyrsta eftirlitið með sannprófanda, í samræmi við 1. mgr., eigi síðar en 12 mánuðum frá þeim degi sem faggildingarvottorð hans var gefið út.

3. Þegar eftirlitsáætlun er gerð skal veita faggildingarstofu aðildarríkis aðgang að dæmigerðum prófunum á starfsemi sannprófanda innan gildissviðs faggildingarvottorðsins, og starfsfólki sem kemur að sannprófunarstörfum, í samræmi við kröfurnar í samhæfða staðlinum sem um getur í 33. gr.

4. Faggildingarstofa aðildarríkis skal ákveða hvort staðfesta skuli áframhaldandi faggildingu á grundvelli niðurstaðna úr eftirlitinu.

5. Þegar sannprófandi annast sannprófun í öðru aðildarríki getur faggildingarstofa aðildarríkisins, sem hefur faggilt sannprófandann, beðið faggildingarstofu aðildarríkisins þar sem sannprófunin á sér stað um að sinna eftirlitsstörfum fyrir sína hönd og á sína ábyrgð.

39. gr.

Endurmat

1. Áður en faggildingarvottorð rennur út skal faggildingarstofa aðildarríkis annast endurmat á sannprófandanum, sem hún hefur gefið út faggildingarvottorð fyrir, til þess að ákvarða hvort framlengja megi gildistíma faggildingarvottorðsins.

2. Þegar endurmatsáætlun er gerð skal tryggja að faggildingarstofa aðildarríkisins meti dæmigert úrtak þeirra starfa sannprófandans sem vottorðið nær til.

Við skipulag og framkvæmd endurmatsins skal faggildingarstofa aðildarríkis uppfylla kröfur samhæfða staðalsins sem um getur í 33. gr.

40. gr.

Sérstakt aukamat

1. Faggildingarstofa aðildarríkis getur, hvenær sem er, látið gera sérstakt aukamat á sannprófanda til að tryggja að hann haldi áfram að uppfylla kröfur þessarar reglugerðar.

2. Til þess að faggildingarstofa aðildarríkis geti metið þörfina á sérstöku aukamati skal sannprófandinn upplýsa stofuna þegar í stað um allar umtalsverðar breytingar viðkomandi faggildingu hans sem varða ýmsa þætti í tengslum við stöðu hans eða rekstur.

Þessar umtalsverðu breytingar skulu fela í sér þær breytingar sem tilgreindar eru í samhæfða staðlinum sem um getur í 33. gr.

41. gr.

Stjórnsýsluráðstafanir

1. Faggildingarstofa aðildarríkis getur fellt faggildingu sannprófanda úr gildi tímabundið eða afturkallað hana ef sannprófandinn uppfyllir ekki kröfur þessarar reglugerðar.

2. Faggildingarstofa aðildarríkis skal fella faggildingu sannprófanda úr gildi tímabundið eða afturkalla hana ef sannprófandinn óskar þess.

3. Faggildingarstofa aðildarríkis skal innleiða, skjalfesta, hrinda í framkvæmd og viðhalda málsmeðferð um tímabundna niðurfellingu og afturköllun á faggildingu í samræmi við samhæfða staðalinn sem um getur í 33. gr.

4. Faggildingarstofa aðildarríkis skal fella faggildingu sannprófanda úr gildi tímabundið ef sannprófandinn:

a) uppfyllir ekki kröfurnar um hæfni, skv. 22. gr., um verklagsreglur við sannprófunarstörf skv. 27. gr., um innri sannprófunarskjöl skv. 28. gr. eða um óhlutdrægni og óhæði skv. 30. gr.,

b) hefur brotið gegn öðrum tilteknum skilmálum og skilyrðum faggildingarstofu aðildarríkisins.

5. Faggildingarstofa aðildarríkis skal afturkalla faggildingu sannprófanda þegar:

a) sannprófanda hefur mistekist að ráða bót á þeim atriðum sem urðu til þess að ákveðið var að fella faggildingarvottorðið tímabundið úr gildi,

b) hátt settur einstaklingur í stjórn sannprófanda hefur verið fundinn sekur um svik,

c) sannprófandi hefur viljandi lagt fram rangar upplýsingar.

6. Unnt skal, í samræmi við málsmeðferðina sem aðildarríkin innleiddu í samræmi við 5. mgr. 5. gr. reglugerðar (EB) nr. 765/2008, að áfrýja ákvörðunum faggildingarstofu aðildarríkis um að fella faggildingu úr gildi tímabundið eða afturkalla hana í samræmi við 1., 4. og 5. mgr.

7. Ákvarðanir faggildingarstofu aðildarríkis um að fella faggildingu úr gildi tímabundið eða afturkalla hana skulu taka gildi um leið og sannprófanda hefur verið tilkynnt um þær. Í ljósi eðlis ósamræmisins skal faggildingarstofa aðildarríkis íhuga afleiðingarnar fyrir störfin, sem innt eru af hendi, áður en þessar ákvarðanir eru teknar.

8. Faggildingarstofa aðildarríkis skal binda enda á tímabundna niðurfellingu faggildingarvottorðs þegar hún hefur fengið í hendur fullnægjandi upplýsingar og kemst að þeirri niðurstöðu að sannprófandi uppfylli kröfur þessarar reglugerðar.

V. KAFLI

KRÖFUR SEM VARÐA FAGGILDINGARSTOFUR Í AÐILDARRÍKJUM

42. gr.

Faggildingarstofur í aðildarríkjum

1. Faggildingarstofur í aðildarríkjum, sem til þess hafa verið tilnefndar skv. 1. mgr. 4. gr. reglugerðar (EB) nr. 765/2008, skulu annast þau verkefni sem varða faggildingu samkvæmt þessari reglugerð.

2. Að því er varðar þessa reglugerð skal faggildingarstofa í aðildarríki sinna störfum sínum í samræmi við þær kröfur sem settar eru fram í samhæfða staðlinum sem um getur í 33. gr.

43. gr.

Matshópur

1. Faggildingarstofa í aðildarríki skal tilnefna matshóp fyrir hvert mat sem er framkvæmt samkvæmt kröfunum í samhæfða staðlinum sem um getur í 33. gr.

2. Matshópurinn skal samanstanda af yfirmatsmanni sem ber ábyrgð á að vinna mat í samræmi við þessa reglugerð og, ef nauðsyn krefur, viðeigandi fjölda matsmanna eða tæknisérfræðinga með viðeigandi þekkingu og reynslu fyrir hið tiltekna gildissvið faggildingar.

3. Í matshópnum skal a.m.k. vera einn einstaklingur, sem hefur eftirfarandi kunnáttu:

a) þekkingu á reglugerð (ESB) 2015/757, þessari reglugerð og annarri viðeigandi löggjöf sem um getur í a-lið 2. mgr. 24. gr.,

b) þekkingu á eiginleikum hinna ýmsu tegunda skipa og á vöktun og skýrslugjöf um losun koltvísýrings, eldsneytisnotkun og öðrum upplýsingum sem máli skipta samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757.

44. gr.

Hæfniskröfur um matsmenn

1. Matsmenn skulu hafa til að bera þá hæfni sem þarf til að annast störfin skv. 36.–41. gr. Í því skyni skal matsmaðurinn:

a) uppfylla kröfur samhæfða staðalsins sem um getur í 33. gr.,

b) hafa þekkingu á úttekt gagnanna og upplýsinganna, sem um getur í b-lið 2. mgr. 24. gr., sem fengist hefur með þjálfun eða ráðgjöf frá aðila sem hefur þekkingu og reynslu af slíkum gögnum og upplýsingum.

2. Auk hæfniskrafnanna, sem settar eru fram í 1. mgr., skulu yfirmatsmenn sýna fram á hæfni til að stjórna matshóp.

3. Til viðbótar við hæfniskröfurnar, sem settar eru fram í 1. mgr., skulu innri rýnar og einstaklingar, sem taka ákvarðanir um að veita, framlengja eða endurnýja faggildingu, búa yfir fullnægjandi þekkingu og reynslu til að meta sannprófunina.

45. gr.

Tæknisérfræðingar

1. Faggildingarstofu í aðildarríki er heimilt að hafa tæknisérfræðinga með í matshópnum til að geta nýtt ítarlega þekkingu og sérþekkingu þeirra á tilteknu viðfangsefni til stuðnings fyrir yfirmatsmann eða matsmann.

2. Tæknisérfræðingar skulu takast á hendur sérstök verkefni undir leiðsögn og samkvæmt fullri ábyrgð yfirmatsmanns í viðkomandi matshóp.

46. gr.

Gagnagrunnur um faggilta sannprófendur

1. Faggildingarstofur í aðildarríkjum skulu koma á fót og hafa umsjón með gagnagrunni sem skal vera aðgengilegur öllum og innihalda a.m.k. eftirfarandi:

a) heiti, faggildingarnúmer og heimilisfang hvers sannprófanda sem viðkomandi faggildingarstofa í aðildarríki hefur faggilt,

b) aðildarríkin þar sem hver sannprófandi annast sannprófun, ef við á,

c) hvaða dag faggildingin var veitt og hvaða dag hún fellur úr gildi,

d) upplýsingar um stjórnsýsluráðstafanir sem hafa verið lagðar á sannprófandann.

2. Tilkynna skal framkvæmdastjórninni um allar breytingar á stöðu sannprófenda með því að nota viðeigandi staðlað sniðmát.

3. Stofnunin, sem er viðurkennd skv. 14. gr. reglugerðar (EB) nr. 765/2008, skal greiða fyrir og samræma aðgang að landsbundnum gagnagrunnum.

VI. KAFLI

LOKAÁKVÆÐI

47. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 22. september 2016.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

VIÐAUKI

Sérstök þekking og reynsla innan siglingageirans

Að því er varðar ákvæði 3. mgr. 24. gr. skal taka tillit til þekkingar og reynslu af eftirfarandi:

— skilningi á viðeigandi reglum í MARPOL-samningnum og SOLAS-samþykktinni, s.s. um orkunýtni skipa ([1]), NOx-tæknikóðanum ([2]), reglugerðinni um brennisteinsoxíð ([3]), reglugerðinni um gæði brennsluolíu ([4]) kóðanum um stöðugleika í óleku ástandi frá 2008 og viðeigandi leiðbeiningum (s.s. leiðbeiningar um stjórnunarkerfi fyrir orkunýtni skipa (SEEMP)),

— hugsanlegum samlegðaráhrifum milli vöktunar og skýrslugjafar í samræmi við reglugerð (ESB) 2015/757 og fyrirliggjandi sértækra stjórnunarkerfa fyrir skip (t.d. alþjóðakóði um öryggisstjórnun skipa (ISM)) og annarra sértækra leiðbeininga fyrir geirann (s.s. leiðbeiningar um stjórnunarkerfi fyrir orkunýtni skipa (SEEMP)),

— upptökum losunar um borð í skipum,

— skráningu sjóferða og aðferða sem tryggir heilleika og nákvæmni skrárinnar yfir sjóferðir (sem fyrirtækið leggur fram),

— áreiðanlegum ytri heimildum (þ.m.t. gögnum um fjarvöktun skipa) sem gætu nýst til að milligáta upplýsingar og gögn frá skipum,

— aðferðum við útreikning á eldsneytisnotkun sem skip nota í reynd,

— beitingu óvissustiga í samræmi við reglugerð (ESB) 2015/757 og viðeigandi leiðbeiningar,

— beitingu losunarstuðla fyrir allt eldsneyti, sem er notað um borð í skipum, þ.m.t. fljótandi jarðgas, blendingseldsneyti og lífeldsneyti,

— meðhöndlun eldsneytis, hreinsun eldsneytis, tankakerfum,

— viðhaldi skipa/gæðaeftirliti með mælibúnaði,

— gögnum um eldsneytistöku, þ.m.t. afhendingarseðlum fyrir eldsneyti,

— aðgerðaskrám, samantektum um sjóferðir og viðkomuhafnir, skipsdagbókum fyrir þilfar,

— viðskiptagögnum, t.d. skipaleigusamningum, farmbréfum,

— gildandi lagaákvæðum,

— rekstri eldsneytistankakerfi skipa,

— raunverulegri ákvörðun á eðlismassa eldsneytis um borð í skipum,

— gagnaflæðisferlum og -aðgerðum til útreiknings á farmi sem fluttur er (í rúmmáli eða massa), eins og varðar tegundir skipa og starfsemi samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757,

— hugtakinu um flutta tonnatölu eins og það varðar tegundir skipa og starfsemi samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757 í samræmi við framkvæmdarreglugerð (ESB) 2016/1928,

— gagnaflæðiferlum sem eru notaðir til að reikna úr vegalengdir sem eru farnar og tímalengd sjóferða í samræmi við reglugerð (ESB) 2015/757,

— vélbúnaði og tæknikerfum sem eru notuð um borð í skipinu til að ákvarða eldsneytisnotkun, starfsemi á sviði flutninga og aðrar viðeigandi upplýsingar.

———————

([1]) Regla 22 í VI. viðauka við MARPOL-samninginn.
([2]) Endurskoðaður tæknikóði um eftirlit með losun köfnunarefnisoxíða frá dísilvélum um borð í skipum (ályktun MEPC.176(58), eins og henni var breytt með ályktun MEPC.177(58)).
([3]) Regla 14 í VI. viðauka við MARPOL-samninginn.
([4]) Regla 18 í VI. viðauka við MARPOL-samninginn.

FRAMKVÆMDARREGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (ESB) 2016/1927 **2017/EES/74/19**

frá 4. nóvember 2016

um sniðmát fyrir vöktunaráætlanir, losunarskýrslur og samræmingarskjöl samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUSAMBANDINS HEFUR,

með hliðsjón af sáttmálanum um starfshætti Evrópusambandsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 frá 29. apríl 2015 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum og um breytingu á tilskipun 2009/16/EB ([1]), einkum 6. gr. (5. mgr.), 12. gr. (2. mgr.) og 17. gr. (5. mgr.),

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Samkvæmt ákvæðum 1. og 3. mgr. 6. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 er þess krafist að félög sendi sannprófanda vöktunaráætlun sem samanstendur af tæmandi og gagnsæjum gögnum um vöktunaraðferðina sem nota á fyrir öll skip sem falla undir gildissvið þeirrar reglugerðar.

2) Til að tryggja að þessar vöktunaráætlanir innihaldi staðlaðar upplýsingar, sem gerir samræmda framkvæmd skyldna varðandi vöktun og skýrslugjöf mögulega, er nauðsynlegt að mæla fyrir um sniðmát, þ.m.t. tæknireglur um samræmda beitingu þeirra.

3) Vöktunaráætlunin ætti að innihalda a.m.k. þættina sem mælt er fyrir um í 3. mgr. 6. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757. Í áætluninni ætti einnig að nota einingar til að ákvarða „farm um borð“, eins og tilgreint er í framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1928 ([2]). Þar sem ekjufarþegaskip (e. *ro-pax*) veita tvær aðskildar tegundir flutningaþjónustu þarf að sundurliða gögn um eldsneytisnotkun og koltvísýringslosun slíkra skipa að því er varðar farm annars vegar og farþega hins vegar. Þetta myndi gera kleift að ákvarða betur meðalorkunýtnivísa skipanna í tengslum við rekstur þeirra.

4) Með fyrirvara um 3. mgr. 6. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757 og í samræmi við síðustu málsgrein 10. gr. þeirrar reglugerðar ætti vöktunaráætlunin að gera kleift að byggja vöktun og skýrslugjöf, í tengslum við eldsneytisnotkun og losun koltvísýrings, á öðrum valfrjálsum viðmiðunum. Þetta myndi auðvelda skilning á uppgefinni meðalorkunýtni. Þetta á einkum við um sundurgreinda vöktun eldsneytisnotkunar í tengslum við upphitun farms og sívirka stýrikerfið (e. *dynamic positioning*) sem og aðgreinda vöktun sjóferða þar sem farmur er um borð og þegar siglt er í hafís.

5) Til að auðvelda félögum, sem hafa yfir að ráða mörgum skipum, að undirbúa vöktunaráætlanir er við hæfi að leyfa félögum að tilgreina hvaða aðferðir, sem lýst er í vöktunaráætluninni, væri viðeigandi að nota fyrir öll þau skip sem eru á ábyrgð félagsins.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 299, 5.11.2016, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 205/2017 frá 27. október 2017 um breytingu á XX. viðauka (Umhverfismál) við EES-samninginn, biður birtingar.

([1]) Stjtíð. ESB L 123, 19.5.2015, bls. 55.

([2]) Framkvæmdarreglugerð framkvæmdastjórnarinnar (ESB) 2016/1928 frá 4. nóvember 2016 um ákvörðun á farmi sem er fluttur um borð í öðrum flokkum skipa en farþegaskipum, ekjuskipum og gámaskipum samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) 2015/757 um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun á losun koltvísýrings frá sjóflutningum (Stjtíð. ESB L 299, 5.11.2016, bls. 22).

6) Þegar félög veita upplýsingar um þætti og aðferðir, sem hluta af vöktunaráætluninni skv. 3. mgr. 6. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, ættu þau einnig að geta vísað til verklagsreglna eða kerfa, sem voru innleidd með skilvirkum hætti sem hluti af gildandi stjórnunarkerfi þeirra, t.d. alþjóðakóðinn um öryggisstjórnun skipa (ISM-kóðinn) ([1]), stjórnunarkerfi fyrir orkunýtni skipa (SEEMP) ([2]), eða til kerfa og eftirlits sem falla undir samræmda gæða-, umhverfis- eða orkustjórnunarstaðla, t.d. EN ISO 9001:2015, EN ISO 14001:2015 eða EN ISO 50001:2011.

7) Til að auðvelda vöktun er við hæfi að leyfa notkun staðalgilda fyrir þá óvissu sem tengist eldsneytisvöktun.

8) Til að gera alla sannprófunarlotuna auðveldari (þ.m.t. vöktun, skýrslugjöf og sannprófun) ætti að líta á upplýsingar um stjórnun, einkum um viðeigandi gagnastjórnun og eftirlitsstarfsemi, sem gagnlegar upplýsingar. Sérstakur hluti sniðmátsins fyrir vöktun ætti að aðstoða félögin við að skipuleggja nauðsynlega stjórnunarþætti.

9) Nauðsynlegt er að mæla fyrir um forskriftir fyrir rafrænt sniðmát fyrir losunarskýrslur. Þetta er nauðsynlegt til að tryggja að sannprófaðar losunarskýrslur séu lagðar fram rafrænt og að þær innihaldi safn fullgildra og staðlaðra árlegra upplýsinga, sem gera má aðgengilegar almenningi og sem gera framkvæmdastjórninni kleift að undirbúa skýrslurnar sem krafist er skv. 21. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757.

10) Losunarskýrslan ætti að taka til þeirra lágmarksupplýsinga sem mælt er fyrir um í 3. mgr. 11. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, þ.m.t. niðurstöðurnar úr árlegri vöktun. Í skýrslunni ætti einnig að vera valfrjálst að birta viðbótarupplýsingar sem gætu auðveldað skilning á meðalorkunýtnivísum í tengslum við rekstur skipa. Þetta varðar einkum þættina um valfrjálsa vöktun eldsneytisnotkunar og koltvísýringslosunar, sem eru sundurliðaðir á grundvelli viðmiðana sem eru tilgreindar í vöktunaráætluninni.

11) Nauðsynlegt er að mæla fyrir um tæknireglur um rafrænt sniðmát fyrir samræmingarskjöl. Þetta tryggir að hægt sé að fella staðlaðar upplýsingar, sem auðvelt er að meðhöndla, inn í þau samræmingarskjöl sem sannprófendur senda á grundvelli skyldu sinnar, skv. 4. mgr. 17. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, um að upplýsa framkvæmdastjórnina og yfirvöld fánaríkisins, án tafar, um útgáfu samræmingarskjals.

12) Félög og faggiltir sannprófendur ættu að hafa aðgang að gagnagrunni ESB yfir hafnarríkiseftirlitsskoðanir fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun (THETIS MRV), sem er sérstakt upplýsingakerfi í Sambandinu, sem er þróað og rekið af Siglingaöryggisstofnun Evrópu, þannig að þau geti notað það til að senda framkvæmdastjórninni og fánaríkjum losunarskýrslur á rafrænu formi, sem hafa verið sannprófaðar með fullnægjandi hætti, og tilheyrandi samræmingarskjöl. Kerfið ætti að vera það sveigjanlegt að það geti einnig tekið til hnattræns kerfis fyrir vöktun, skýrslugjöf og sannprófun í tengslum við losun gróðurhúsalofttegunda.

13) Framkvæmdastjórnin hefur haft samráð við hlutaðeigandi aðila um bestu starfsvenjur að því er varðar málefnin sem fjallað er um í þessari reglugerð. Samráðið fór fram fyrir tilstuðlan „undirhópa sérfræðingahópsins um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun (MRV) á sviði sjóflutninga“, sem komið var á fót innan vébanda evrópska samstarfsvettvangsins um sjálfbæra sjóflutninga (e. *European Sustainable Shipping Forum*).

14) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit nefndarinnar um loftslagsbreytingar, sem komið var á fót skv. 26. gr. reglugerðar Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 525/2013 ([3]).

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Viðfangsefni

Í þessari reglugerð er mælt fyrir um sniðmát og tæknireglur í tengslum við framlagningu vöktunaráætlana, losunarskýrslna og samræmingarskjala samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757.

([1]) Samþykkt af Alþjóðasiglingamálastofnuninni (IMO) með ályktun þingsins A.741(18).
([2]) Regla 22 í VI. viðauka við Marpol-samninginn.
([3]) Reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (ESB) nr. 525/2013 frá 21. maí 2013 um fyrirkomulag við vöktun og skýrslugjöf að því er varðar losun gróðurhúsalofttegunda og skýrslugjöf að því er varðar aðrar upplýsingar á landsvísu og á vettvangi Sambandsins sem varða loftslagsbreytingar og um niðurfellingu á ákvörðun nr. 280/2004/EB (Stjtíð. ESB L 165, 18.6.2013, bls. 13).

2. gr.

Sniðmát fyrir vöktunaráætlun

1. Félög skulu semja vöktunaráætlunina, sem um getur í 6. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, með því að nota sniðmátið sem samsvarar fyrirmyndinni í I. viðauka.

2. Félögum er heimilt að skipta vöktunaráætluninni upp í tiltekna hluta þar sem annar snýr að félaginu og hinn að skipunum, að því tilskildu að fjallað sé um alla þá þætti sem settir eru fram í I. viðauka.

Upplýsingarnar í hlutanum sem snýr að félaginu, sem geta t.d. verið töflur B.2, B.5, D, E og F.1 í I. viðauka, skulu gilda um hvert skip sem félagið á að leggja fram vöktunaráætlun fyrir skv. 6. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757.

3. gr.

Rafrænt sniðmát fyrir losunarskýrslu

1. Til að leggja fram losunarskýrslur, skv. 1. mgr. 11. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, skulu félögin nota rafræna útgáfu af sniðmátinu, sem er tiltækt í sjálfvirka upplýsingakerfi Sambandsins, THETIS MRV, sem Siglingaöryggisstofnun Evrópu starfrækir (hér á eftir nefnt „THETIS MRV-kerfið“).

2. Rafræn útgáfa sniðmátsins fyrir losunarskýrslurnar, sem um getur í 1. mgr., skal innihalda upplýsingarnar sem settar eru fram í II. viðauka.

4. gr.

Rafrænt sniðmát fyrir samræmingarskjal

1. Til að gefa út samræmingarskjal, skv. 4. mgr. 17. gr. reglugerðar (ESB) 2015/757, skal sannprófandi útvega viðeigandi gögn með því að nota rafræna útgáfu af sniðmátinu sem er tiltækt í THETIS MRV-kerfinu.

2. Rafræn útgáfa sniðmátsins fyrir samræmingarskjalið, sem um getur í 1. mgr., skal innihalda upplýsingarnar sem settar eru fram í III. viðauka.

5. gr.

Gildistaka

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

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

Gjört í Brussel 4. nóvember 2016.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Jean-Claude JUNCKER

forseti.

———

I. VIÐAUKI

Sniðmát fyrir vöktunaráætlanir

A-hluti Endurskoðunarblað

Útgáfa nr.	Viðmiðunardagsetning	Staða við viðmiðunar-dagsetningu ([1])	Tilvísun í kafla, ef þeir hafa verið endurskoðaðir eða þeim breytt, þ.m.t. stutt útskýring á breytingunum

([1]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „vinnsludrög“, „lokadrög sem send eru sannprófanda“, „metið“, „breyting sem krefst ekki endurmats“.

B-hluti Grunngögn

Tafla B.1 Auðkenning skips

Nafn skips	
IMO-auðkennisnúmer	
Skráningarhöfn	
Heimahöfn (ef ekki sú sama og skráningarhöfn)	
Nafn skipseiganda	
Einkvæmt IMO-auðkennisnúmer félags og skráðs eiganda	
Tegund skips ([1])	
Burðargeta (í tonnum)	
Brúttótonn	
Flokkunarfélag (valkvætt)	
Hafísflokkur (valkvætt) ([2])	
Fánaríki (valkvætt)	
Opinn textareitur fyrir viðbótarupplýsingar um eiginleika skipsins (valkvætt)	

([1]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „farþegaskip“, „ekjuskip“, „gámaskip“, „olíuflutningaskip“, „efnaflutningaskip“, „flutningaskip fyrir fljótandi jarðgas“, „gasflutningaskip“, „búlkaskip“, „lausavöruskip“, „frystiflutningaskip“, „bílaflutningaskip“, „fjölnota skip“, „ekjufarþegaskip“, „gáma-/ekjuflutningaskip“, „aðrar tegundir skipa“.

([2]) Velja skal einn af heimskautaflokkunum PC1 — PC7 eða einn af finnsk-sænsku hafísflokkunum (IC, IB, IA eða IA-gæðaflokkur).

Tafla B.2. Upplýsingar um félag

Heiti félags	
Heimilisfang lína 1	
Heimilisfang lína 2	
Borg	
Ríki/sýsla/svæði	
Póstnúmer	
Land	
Tengiliður	
Símanúmer	
Tölvupóstfang	

Tafla B.3. Upptök losunar og eldsneytistegundir sem notaðar eru

Upptök losunar, tilvísunarnúmer	Upptök losunar (heiti og tegund)	Tæknilýsing á upptökum losunar(afköst/afl, sérstök brennsluolíunotkun (SFOC), uppsetningarár, auðkennisnúmer ef um er að ræða marga nákvæmlega eins staði fyrir upptök losunar, o.s.frv.)	Tegundir eldsneytis sem eru (hugsanlega) notaðar ([1])

([1]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „svartolía“, „létt brennsluolía“, „dísilolía/gasolía“, „fljótandi jarðolíugas (própan)“, „fljótandi jarðolíugas (bútan)“, „fljótandi jarðgas“, „metanól“, „etanól“, „annað eldsneyti með óstaðlaðan losunarstuðul“.

Tafla B.4. Losunarstuðlar

Tegund eldsneytis	IMO-losunarstuðlarí tonnum af CO_2/tonnum af eldsneyti)
Svartolía (Tilvísun: ISO 8217, flokkur RME til RMK)	3,114
Létt brennsluolía (Tilvísun: ISO 8217, flokkur RMA til RMD)	3,151
Dísilolía/gasolía (Tilvísun: ISO 8217, flokkur DMX til DMB)	3,206
Fljótandi jarðolíugas (própan)	3,000
Fljótandi jarðolíugas (bútan)	3,030
Fljótandi jarðgas	2,750

Tegund eldsneytis	IMO-losunarstuðlarí tonnum af CO_2/tonnum af eldsneyti)
Metanól	1,375
Etanól	1,913
Annað eldsneyti með óstaðlaðan losunarstuðul	

Ef óstaðlaðir losunarstuðlar eru notaðir:

Óstaðlað eldsneyti	Losunarstuðull	Aðferðir til að ákvarða losunarstuðulinn (aðferð fyrir sýnatöku, greiningaraðferðir og lýsing á rannsóknarstofum, sem notaðar eru, ef einhverjar)

Tafla B.5. Verklagsreglur, kerfi og ábyrgðarsvið í því skyni að uppfæra skrá yfir upptök losunar svo hún sé tæmandi

Heiti verklagsreglu	Umsjón með því að skrá yfir upptök losunar sé tæmandi
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsaðferðum kerfis um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun (MRV-kerfis) í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunar-áætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

C-hluti Gögn um starfsemi

Tafla C.1. Skilyrði fyrir undanþágunni sem um getur í 2. mgr. 9. gr.

Liður	Staðfestingarreitur
Lágmarksfjöldi áætlaðra sjóferða á hverju skýrslutímabili, sem falla, samkvæmt ferðaáætlun skipsins, undir gildissvið reglugerðar ESB um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun	
Eru áætlaðar sjóferðir á hverju skýrslutímabili, sem, samkvæmt ferðaáætlun skipsins, falla ekki undir gildissvið reglugerðar ESB um vöktun, skýrslugjöf og sannprófun? ([1])	
Hafa skilyrðin í 2. mgr. 9. gr. verið uppfyllt? ([2])	
Ef já, er þá ætlunin að nýta undanþáguna frá því að vakta magns þess eldsneytis sem er notað í hverri sjóferð? ([3])	

([1]) Velja skal annaðhvort „já“ eða „nei“.
([2]) Velja skal annaðhvort „já“ eða „nei“.
([3]) Velja skal „já“, „nei“ eða „á ekki við“.

Tafla C.2. Vöktun eldsneytisnotkunar

C.2.1. Aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða eldsneytisnotkun fyrir hver upptök losunar:

Upptök losunar ([1])	Valdar aðferðir fyrir eldsneytisnotkun ([2])

([1]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „öll upptök“, „aðalvélar“, „hjálparvélar“, „gasvélar“, „katlar“ eða „búnaður sem framleiðir óhvarfgjarnar lofttegundir“.
([2]) Velja skal einn eða fleiri af eftirfarandi flokkum: „aðferð A: afhendingarseðill fyrir skipaeldsneyti (BDN) og reglubundin athugun á birgðum eldsneytisgeyma“, „aðferð B: vöktun eldsneytisgeyma um borð“, „aðferð C: streymismælar fyrir viðeigandi brunaferli“ eða „aðferð D: bein mæling á losun koltvísýrings“.

C.2.2. Verklagsreglur um hvernig eldsneyti, sem hefur verið tekið, og eldsneyti, sem fyrir er í geymum, er ákvarðað:

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun eldsneytis, sem hefur verið tekið, og eldsneyti sem fyrir er í geymum
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

C.2.3. Regluleg milligátun með áfylltu eldsneytismagni, eins og fram kemur á afhendingarseðli fyrir skipaeldsneyti, og áfylltu eldsneytismagni sem kemur fram í innbyggðum mælikerfum:

Heiti verklagsreglu	Regluleg milligátun með áfylltu eldsneytismagni, eins og fram kemur á afhendingarseðlum fyrir skipaeldsneyti, og áfylltu eldsneytismagni sem kemur fram í innbyggðum mælikerfum:
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	

C.2.4. Lýsing á mælitækjum sem notuð eru:

Mælibúnaður (heiti)	Mæliþættir sem notaðir eru (t.d. upptök losunar, geymar)	Tæknilýsing (forskrift, aldur, viðhaldstímabil)

C.2.5. Verklagsreglur um að skrá, sækja, senda og varðveita upplýsingar varðandi mælingar:

Heiti verklagsreglu	Um að skrá, sækja, senda og varðveita upplýsingar varðandi mælingar
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

C.2.6. Aðferð til að ákvarða eðlismassa:

Eldsneytistegund/-geymir	Aðferð til að ákvarða gildi raunverulegs eðlismassa eldsneytis sem geymt er ([1])	Aðferð til að ákvarða gildi raunverulegs eðlismassa eldsneytis í geymum ([2])

([1]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „innbyggður mælibúnaður“, „eldsneytisbirgir“ eða „prófun á rannsóknarstofu“.
([2]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „mælibúnaður“, „eldsneytisbirgir“, „prófun á rannsóknarstofu“.

C.2.7. Óvissustig í tengslum við eldsneytisvöktun:

Vöktunaraðferð ([1])	Nálgun sem er notuð ([2])	Gildi

([1]) Velja skal einn eða fleiri af eftirfarandi flokkum: „aðferð A: afhendingarseðill fyrir skipaeldsneyti og reglubundin athugun á birgðum eldsneytisgeyma“, „aðferð B: vöktun eldsneytisgeyma um borð“, „aðferð C: streymismælar fyrir viðeigandi brunaferli“ eða „aðferð D: bein mæling á losun koltvísýrings“.
([2]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „staðalgildi“ eða „mat sem varðar tiltekið skip“.

C.2.8. Verklagsreglur um að ábyrgjast gæðatryggingu fyrir mælibúnað:

Heiti verklagsreglu	Um að ábyrgjast gæðatryggingu fyrir mælibúnað
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

C.2.9. Aðferð til að ákvarða sundurliðun eldsneytisnotkunar fyrir farm annars vegar og farþega hins vegar (á aðeins við um ekjufarþegaskip):

Heiti aðferðar	Ákvörðun sundurliðunar eldsneytisnotkunar fyrir farm annars vegar og farþega hins vegar
Úthlutunaraðferð sem notuð er samkvæmt EN 16258 ([1])	
Lýsing á aðferð til að ákvarða massa farms og fjölda farþega, þ.m.t. möguleg notkun á staðalgildum fyrir þyngd farmeininga/ reinarmetra (ef notuð er massaaðferð)	
Lýsing á aðferð til að ákvarða það rými á þilfarinu sem ætlað er fyrir farm og farþega, þ.m.t. hengiþilför og fólksbifreiðar á farmþilfari (ef notuð er flatarmálsaðferð)	
Eldsneytisnotkun sem er sundurliðuð (í %) fyrir farm annars vegar og farþega hins vegar (aðeins ef notuð er flatarmálsaðferð)	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari aðferð	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

([1]) Velja skal annaðhvort „massaaðferð“ eða „flatarmálsaðferð“.

C.2.10. Verklagsreglur um að ákvarða og skrá eldsneytisnotkun í sjóferðum þar sem farmur er um borð (valfrjáls vöktun):

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning eldsneytisnotkunar í sjóferðum þar sem farmur er um borð:
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

C.2.11. Verklagsreglur um að ákvarða og skrá eldsneytisnotkun í tengslum við upphitun farms (valfrjáls vöktun fyrir efnaflutningaskip):

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning eldsneytisnotkunar í tengslum við upphitun farms
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning eldsneytisnotkunar í tengslum við upphitun farms
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

C.2.12. Verklagsreglur um að ákvarða og skrá eldsneytisnotkun í tengslum við sívirka stýrikerfið (valfrjáls vöktun fyrir olíuflutningaskip og „aðrar tegundir skipa“):

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning eldsneytisnotkunar í tengslum við sívirka stýrikerfið
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla C.3. Skrá yfir sjóferðir

Heiti verklagsreglu	Skráning og varðveisla tæmandi upplýsinga um sjóferðir
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skrásetning og vöktun sjóferða o.s.frv.), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla C.4. Vegalengd sem farin er

Heiti verklagsreglu	Skráning og ákvörðun vegalengdar sem farin er í hverri sjóferð
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skrásetning og stjórnun upplýsinga um vegalengdir), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Verklagsreglur um að ákvarða og skrá vegalengdina sem farin er þegar siglt er í hafís (valfrjáls vöktun):

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning vegalengdar sem farin er þegar siglt er í hafís
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skrásetning og stjórnun upplýsinga um vegalengdir og vetrarskilyrði), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla C.5. Magn farms um borð og farþegafjöldi

Heiti verklagsreglu	Skráning og ákvörðun magns farms um borð og/eða farþegafjölda
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skráning og ákvörðun magns farms um borð og/eða farþegafjölda og notkun staðalgilda fyrir massa farmeininga, ef við á), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	

Heiti verklagsreglu	Skráning og ákvörðun magns farms um borð og/eða farþegafjölda
Farm-/farþegaeining ([1])	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

([1]) Að því er varðar farþegaskip skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp sem „farþegar“.
Að því er varðar ekjuskip, gámaskip, olíuflutningaskip, efnaflutningaskip, gasflutningaskip, búlkaskip, frystiflutningaskip og fjölnota skip skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp sem „tonn“.
Að því er varðar flutningaskip fyrir fljótandi jarðgas, gáma-/ekjufarþegaskip skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp í „rúmmetrum“.
Að því er varðar lausavöruskip skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp með því að velja einn af eftirfarandi flokkum: „flutt tonnatala“, „flutt tonnatala og tonn“.
Að því er varðar bílaflutningaskip skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp með því að velja einn af eftirfarandi flokkum: „tonn“, „tonn og flutt tonnatala“.
Að því er varðar ekjufarþegaskip skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp sem „tonn“ og „farþegar“.
Að því er varðar aðrar tegundir skipa skal „farm-/farþegaeiningin“ gefin upp með því að velja einn af eftirfarandi flokkum: „tonn“, „flutt tonnatala“.

Verklagsreglur um að ákvarða og skrá meðaleðlismassa farms sem fluttur er (valfrjáls vöktun fyrir efnaflutningaskip, búlkaskip og fjölnota skip):

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning meðaleðlismassa farms sem fluttur er
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skráning og stjórnun upplýsinga um eðlismassa farms), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla C.6. Úthaldstími á sjó

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning úthaldstíma á sjó frá brottfararhöfn til komuhafnar
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skráning og stjórnun upplýsinga um brottför úr höfn og komu til hafnar), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning úthaldstíma á sjó frá brottfararhöfn til komuhafnar
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Verklagsreglur um að ákvarða og skrá úthaldstíma á sjó þegar siglt er í hafís (valfrjáls vöktun):

Heiti verklagsreglu	Ákvörðun og skráning úthaldstíma á sjó þegar siglt er í hafís
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu (þ.m.t. skráning og stjórnun upplýsinga um brottför úr höfn og komu til hafnar sem og um vetrarskilyrði), ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Formúlur og gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

D-hluti Gagnaeyður

Tafla D.1. Aðferðir sem nota á til að meta eldsneytisnotkun

Heiti aðferðar	Aðferð sem nota á til að meta eldsneytisnotkun
Varaaðferð fyrir vöktun ([1])	
Formúlur sem eru notaðar	
Lýsing á aðferðinni til að meta eldsneytisnotkun	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari aðferð	
Gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

([1]) Velja skal einn af eftirfarandi flokkum: „aðferð A: afhendingarseðill fyrir skipaeldsneyti og reglubundin athugun á birgðum eldsneytisgeyma“, „aðferð B: vöktun eldsneytisgeyma um borð“, „aðferð C: streymismælar fyrir viðeigandi brunaferli“, „aðferð D: bein mæling á losun koltvísýrings“ eða „á ekki við“. Valinn flokkur verður að vera annar en sá flokkur sem valinn er undir liðnum „Valdar aðferðir fyrir eldsneytisnotkun“ í töflu C.2. (Vöktun eldsneytisnotkunar — Aðferðir sem eru notaðar til að ákvarða eldsneytisnotkun fyrir hver upptök losunar).

Tafla D.2. Aðferðir sem á að nota til að meðhöndla gagnaeyður varðandi vegalengd sem farin er

Heiti aðferðar	Aðferð til að meðhöndla gagnaeyður varðandi vegalengd sem farin er
Formúlur sem eru notaðar	
Lýsing á aðferð til að meðhöndla gagnaeyður	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari aðferð	
Gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla D.3. Aðferðir sem á að nota til að meðhöndla gagnaeyður varðandi farm um borð

Heiti aðferðar	Aðferð til að meðhöndla gagnaeyður varðandi farm um borð
Formúlur sem eru notaðar	
Lýsing á aðferð til að meðhöndla gagnaeyður	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari aðferð	
Gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla D.4. Aðferðir sem á að nota til að meðhöndla gagnaeyður varðandi úthaldstíma á sjó

Heiti aðferðar	Aðferð til að meðhöndla gagnaeyður varðandi úthaldstíma á sjó
Formúlur sem eru notaðar	
Lýsing á aðferð til að meðhöndla gagnaeyður	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari aðferð	
Gagnalindir	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

E-hluti Stjórnun

Tafla E.1. Reglubundin athugun á því hvort vöktunaráætlunin sé fullnægjandi

Heiti verklagsreglu	Reglubundin athugun á því hvort vöktunaráætlunin sé fullnægjandi
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla E.2. Eftirlitsstarfsemi: Gæðatrygging og áreiðanleiki upplýsingatæknikerfis

Heiti verklagsreglu	Stjórnun upplýsingatækni (t.d. aðgangsstýring, öryggisafritun, endurheimt og öryggi)
Tilvísun í verklagsreglu	
Stutt lýsing á verklagsreglu	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á viðhaldi gagna	
Staðsetning skráa	
Heiti kerfis sem notað er (ef við á)	
Skrá yfir viðeigandi stjórnunarkerfi sem fyrir eru	

Tafla E.3. Eftirlitsstarfsemi: Innri endurskoðun og sannprófun gagna MRV-kerfisins í Sambandinu

Heiti verklagsreglu	Innri endurskoðun og sannprófun gagna MRV-kerfisins í Sambandinu
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla E.4. Eftirlitsstarfsemi: Leiðréttingar og aðgerðir til úrbóta

Heiti verklagsreglu	Leiðréttingar og aðgerðir til úrbóta
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla E.5. Eftirlitsstarfsemi: Útvistuð starfsemi (ef við á)

Heiti verklagsreglu	Útvistuð starfsemi
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

Tafla E.6. Eftirlitsstarfsemi: Skjalahald

Heiti verklagsreglu	Skjalahald
Tilvísun í núverandi verklagsreglu	
Útgáfa núverandi verklagsreglu	
Lýsing á verklagsreglum MRV-kerfisins í Sambandinu, ef þeim hefur ekki þegar verið lýst utan vöktunaráætlunarinnar	
Nafn eða staða þess einstaklings sem ber ábyrgð á þessari verklagsreglu	
Staðsetning skráa	
Heiti upplýsingatæknikerfis sem notað er (ef við á)	

F-hluti Frekari upplýsingar

Tafla F.1. Skrá yfir skilgreiningar og skammstafanir

Skammstöfun, upphafsstafaorð, skilgreining	Skýring

Tafla F.2. Viðbótarupplýsingar

II. VIÐAUKI

Sniðmát fyrir losunarskýrslur

A-hluti Gögn sem auðkenna skipið og félagið

1. Nafn skips.

2. IMO-auðkennisnúmer.

3. a) Skráningarhöfn EÐA

   b) Heimahöfn.

4. Flokkur skipa [fellivalmynd: „farþegaskip“, „ekjuskip“, „gámaskip“, „olíuflutningaskip“, „efnaflutningaskip“, „flutningaskip fyrir fljótandi jarðgas“, „gasflutningaskip“, „búlkaskip“, „lausavöruskip“, „frystiflutningaskip“, „bílaflutningaskip“, „fjölnota skip“, „ekjufarþegaskip“, „gáma-/ekjuflutningaskip“, „aðrar tegundir skipa“].

5. Hafísflokkur skips (ekki skyldubundinn — aðeins ef hann er tilgreindur í vöktunaráætluninni) [fellivalmynd: heimskautaflokkur PC1 — PC7, finnsk-sænsku hafísflokkarnir IC, IB, IA eða IA- gæðaflokkur]

6. Tæknigeta skips.

   a) Orkunýtnivísir hönnunar (EEDI), ef þess er krafist samkvæmt reglum 19 og 20 í 4. kafla VI. viðauka við MARPOL-samninginn, gefin upp í grömmum af koltvísýringi á hverja tonnsjómílu EÐA

   b) Áætlað gildi vísis (EIV), reiknað í samræmi við IMO-ályktun MEPC.215(63), gefið upp í grömmum af koltvísýringi á hverja tonnsjómílu.

7. Nafn skipseiganda.

8. Heimilisfang skipseiganda og aðalstarfsstöð hans: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer, land.

9. Heiti félags (einungis ef það er ekki skipseigandinn).

10. Heimilisfang félags (einungis ef það er ekki skipseigandinn) og aðalstarfsstöð þess: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer/land.

11. Tengiliður

    a) nafn: titill, eiginnafn, kenninafn, starfsheiti,

    b) heimilisfang: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer, land,

    c) sími,

    d) tölvupóstfang.

B-hluti Sannprófun

1. Nafn sannprófanda.

2. Heimilisfang sannprófanda og aðalstarfsstöð hans: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer, land.

3. Faggildingarnúmer.

4. Yfirlýsing sannprófanda.

C-hluti Upplýsingar um vöktunaraðferðina, sem notuð var, og tilheyrandi óvissustig

1. Upptök losunar [fellivalmynd: „öll upptök“, „aðalvélar“, „hjálparvélar“, „gasvélar“, „katlar“, „búnaður sem framleiðir óhvarfgjarnar lofttegundir“].

2. Vöktunaraðferð eða vöktunaraðferðir sem eru notaðar (fyrir hver upptök losunar) [fellivalmynd: „aðferð A: afhendingarseðill fyrir skipaeldsneyti og reglubundin athugun á birgðum eldsneytisgeyma“, „aðferð B: vöktun eldsneytisgeyma um borð“, „aðferð C: streymismælar fyrir viðeigandi brunaferli“, „aðferð D: bein mæling á losun koltvísýrings“].

3. Tilheyrandi óvissustig, gefið upp í % (fyrir hverja vöktunaraðferð sem notuð er).

D-hluti Niðurstöður úr árlegri vöktun á mæliþáttunum í samræmi við 10. gr.

ELDSNEYTISNOTKUN OG LOSUN KOLTVÍSÝRINGS

1. Magn og losunarstuðull fyrir hverja tegund eldsneytis sem notað er í heild:

   a) eldsneytistegund [fellivalmynd: „svartolía“, „létt brennsluolía“, „dísilolía/gasolía“, „fljótandi jarðolíugas (própan)“, „fljótandi jarðolíugas (bútan)“, „fljótandi jarðgas“, „metanól“, „etanól“, „annað eldsneyti með óstaðlaðan losunarstuðul“],

   b) losunarstuðull, gefinn upp í tonnum af koltvísýringi á hvert tonn af eldsneyti,

   c) heildareldsneytisnotkun, gefin upp í tonnum af eldsneyti.

2. Uppsöfnuð heildarlosun koltvísýrings innan gildissviðs þessarar reglugerðar, gefin upp í tonnum af koltvísýringi.

3. Uppsöfnuð losun koltvísýrings úr öllum sjóferðum milli hafna sem falla undir lögsögu aðildarríkis, gefin upp í tonnum af koltvísýringi.

4. Uppsöfnuð losun koltvísýrings í tengslum við allar sjóferðir sem hófust í höfnum, sem falla undir lögsögu aðildarríkis, gefin upp í tonnum af koltvísýringi.

5. Uppsöfnuð losun koltvísýrings í tengslum við allar sjóferðir til hafna, sem falla undir lögsögu aðildarríkis, gefin upp í tonnum af koltvísýringi.

6. Losun koltvísýrings sem átti sér stað í höfnum sem falla undir lögsögu aðildarríkis, meðan skipið var við bryggju, gefin upp í tonnum af koltvísýringi.

7. Heildareldsneytisnotkun og uppsöfnuð heildarlosun koltvísýrings í tengslum við farþegaflutninga (fyrir ekjufarþegaskip), gefin upp í tonnum af eldsneyti og í tonnum af koltvísýringi.

8. Heildareldsneytisnotkun og uppsöfnuð heildarlosun koltvísýrings í tengslum við farmflutninga (fyrir ekjufarþegaskip), gefin upp í tonnum af eldsneyti og í tonnum af koltvísýringi.

9. Heildareldsneytisnotkun og uppsöfnuð heildarlosun koltvísýrings í tengslum við sjóferðir þar sem farmur er um borð (valfrjálst), gefin upp í tonnum af eldsneyti og í tonnum af koltvísýringi.

10. Heildareldsneytisnotkun í tengslum við upphitun farms (fyrir efnaflutningaskip, valfrjálst), gefin upp í tonnum af eldsneyti.

11. Heildareldsneytisnotkun í tengslum við sívirka stýrikerfið (fyrir olíuflutningaskip og „aðrar tegundir skipa“, valfrjálst), gefin upp í tonnum af eldsneyti.

VEGALENGD SEM FARIN ER, ÚTHALDSTÍMI Á SJÓ OG HEILDARFLUTNINGASTARFSEMI

1. Heildarvegalengd sem farin er, gefin upp í sjómílum.

2. Heildarvegalengd sem farin er þegar siglt er í hafís (valfrjálst), gefin upp í sjómílum.

3. Heildarúthaldstími á sjó, gefinn upp í klukkustundum.

4. Heildarúthaldstími á sjó þegar siglt er í hafís (valfrjálst), gefinn upp í klukkustundum.

5. Heildarflutningastarfsemi, gefin upp í

farþegasjómílum (fyrir farþegaskip),

tonnsjómílum (fyrir ekjuskip, gámaskip, olíuflutningaskip, efnaflutningaskip, gasflutningaskip, búlkaskip, frystiflutningaskip, bílaflutningaskip, fjölnotaflutningaskip),

rúmmertrasjómílum (fyrir flutningaskip fyrir fljótandi jarðgas, gáma-/ekjuflutningaskip),

flutta tonnatölu á hverja sjómílu (fyrir lausavöruskip),

farþegasjómílum OG tonnsjómílum (fyrir ekjufarþegaskip),

tonnsjómílum EÐA fluttri tonnatölu á hverja sjómílu (fyrir aðrar tegundir skipa).

6. Annar mæliþáttur fyrir heildarflutningastarfsemi (valfrjálst), gefinn upp í

tonnsjómílum (fyrir lausavöruskip),

fluttri tonnatölu á hverja sjómílu (fyrir bílaflutningaskip).

7. Meðaleðlismassi farms sem fluttur er á skýrslutímabilinu (fyrir efnaflutningaskip, búlkaskip og fjölnota skip, valfrjálst), gefinn upp í tonnum á hvern rúmmetra.

ORKUNÝTNI

1. Meðalorkunýtni

   a) eldsneytisnotkun miðað við vegalengd, gefin upp í kílógrömmum á hverja sjómílu,

   b) eldsneytisnotkun á hverja einstaka flutningastarfsemi, gefin upp í grömmum á hverja farþegasjómílu, grömmum á hverja tonnsjómílu, grömmum á hverja rúmmetrasjómílu, grömmum á flutta tonnatölu á hverja sjómílu eða grömmum á hverja farþegasjómílu OG grömmum á hverja tonnsjómílu, eins og við á fyrir viðeigandi flokk skipa,

   c) losun koltvísýrings miðað við vegalengd, gefin upp í kílógrömmum af koltvísýringi á hverja sjómílu,

   d) losun koltvísýrings á hverja einstaka flutningastarfsemi, gefin upp í grömmum af koltvísýringi á hverja farþegasjómílu, grömmum af koltvísýringi á hverja tonnsjómílu, grömmum af koltvísýringi á hverja rúmmetrasjómílu, grömmum af koltvísýringi á flutta tonnatölu á hverja sjómílu eða grömmum af koltvísýringi á hverja farþegasjómílu OG grömmum af koltvísýringi á hverja tonnsjómílu, eins og við á fyrir viðeigandi flokk skipa.

2. Annar mæliþáttur fyrir meðalorkunýtni á hverja flutningastarfsemi (valfrjálst), gefinn upp í

grömmum á hverja tonnsjómílu og grömmum af koltvísýringi á hverja tonnsjómílu (fyrir lausavöruskip),

grömmum á flutta tonnatölu á hverja sjómílu og grömmum af koltvísýringi á flutta tonnatölu á hverja sjómílu (fyrir bílaflutningaskip).

3. Sundurgreind meðalorkunýtni (eldsneytisnotkun og losun koltvísýrings) í tengslum við sjóferðir þar sem farmur er um borð, gefin upp í

kílógrömmum á hverja sjómílu,

grömmum á hverja tonnsjómílu, grömmum á hverja rúmmetrasjómílu, grömmum á flutta tonnatölu á hverja sjómílu eða grömmum á hverja farþegasjómílu, eins og við á fyrir viðeigandi flokk skipa,

kílógrömmum af koltvísýringi á hverja sjómílu,

grömmum af koltvísýringi á hverja tonnsjómílu, grömmum af koltvísýringi á hverja rúmmetrasjómílu, grömmum af koltvísýringi á flutta tonnatölu á hverja sjómílu eða grömmum af koltvísýringi á hverja farþegasjómílu, eins og við á fyrir viðeigandi flokk skipa.

4. Viðbótarupplýsingar til að auðvelda skilning á tilkynntum meðalorkunýtnivísum fyrir skipið (valkvætt).

———

III. VIÐAUKI

Sniðmát fyrir samræmingarskjöl

Það vottast hér með að losunarskýrsla skipsins „NAFN“, sem tekur til skýrslutímabilsins „ÁR N-1“, telst fullnægjandi að því er varðar kröfur reglugerðar (ESB) 2015/757.

Þetta samræmingarskjal er gefið út „DAGUR/MÁNUÐUR/ÁR N“.

Þetta samræmingarskjal tengist losunarskýrslu nr. „NÚMER“ og gildir til og með 30. JÚNÍ „ÁR N + 1“.

I. **Upplýsingar um skipið**

1. Nafn skips.
2. IMO-auðkennisnúmer.
3. a) skráningarhöfn EÐA

   b) heimahöfn.
4. Flokkur skipa [fellivalmynd: „farþegaskip“, „ekjuskip“, „gámaskip“, „olíuflutningaskip“, „efnaflutningaskip“, „flutningaskip fyrir fljótandi jarðgas“, „gasflutningaskip“, „búlkaskip“, „lausavöruskip“, „frystiflutningaskip“, „bílaflutningaskip“, „fjölnota skip“, „ekjufarþegaskip“, „gáma-/ekjuflutningaskip“, „aðrar tegundir skipa“].
5. Fánaríki/skráningarhöfn.
6. Brúttótonnatala.

II. **Upplýsingar um skipseiganda**

1. Nafn skipseiganda.
2. Heimilisfang skipseiganda og aðalstarfsstöð hans: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer, land.

III. **Upplýsingar um félag, sem uppfyllir skuldbindingarnar samkvæmt reglugerð (ESB) 2015/757 (valfrjáls reitur)**

1. Heiti félags.
2. Heimilisfang félags og aðalstarfsstöð: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer, land.

IV. **Sannprófandi**

1. Faggildingarnúmer.
2. Nafn sannprófanda.
3. Heimilisfang félags og aðalstarfsstöð: heimilisfang lína 1, heimilisfang lína 2, borg, ríki/sýsla/svæði, póstnúmer, land.

_____